



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol de la conexina 43 en las propiedades fisiológicas de la glía envolvente y en la plasticidad de la vía aferente olfatoria

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Ana Paula Piantanida

Director de Tesis: Dra. Lorena Rela

Consejero de estudios: Dra Lidia Szczupak

Lugar de Trabajo: Grupo de Neurociencia de Sistemas, IFIBIO "Houssay", CONICET, FMED, UBA

Buenos Aires, Argentina, 2016

Rol de la conexina 43 en las propiedades fisiológicas de la glía envolvente y en la plasticidad de la vía aferente olfatoria

Resumen

El epitelio olfatorio produce neuronas sensoriales durante toda la vida, que extienden axones a lo largo del nervio olfatorio y establecen sinapsis integrándose al circuito del bulbo olfatorio. Este nervio es plástico y regenera luego de daño. Los axones sensoriales están asociados a la glía envolvente olfatoria, a la cual se atribuye la permisividad para el reemplazo de neuronas sensoriales, ya que produce factores neurotróficos y promueve el crecimiento axonal, tanto *in vitro* como en modelos de daño. Sin embargo, prácticamente se desconocen los mecanismos subyacentes a este sostén del crecimiento axonal y a su potencial participación en el mantenimiento del circuito olfatorio.

La glía envolvente forma redes mediadas por uniones comunicantes (*gap junctions*), formadas por conexinas, que en otros tipos de glía acompañan remodelaciones asociadas a daño y son esenciales para sostener funciones gliales. La glía envolvente expresa principalmente conexina 43 (Cx43), que podría ser esencial para el mantenimiento del nervio, promoviendo la liberación concertada de neurotrofinas o participando como molécula de adhesión.

Evaluamos si la degeneración/regeneración posteriores al daño del nervio olfatorio se asocian con plasticidad en las redes gliales asociadas. Durante la recuperación del sistema luego de un daño, observamos inmunorreactividad reducida para Cx43 en la glía envolvente y aumento de dicha inmunomarca en el bulbo olfatorio, sugiriendo el remodelado diferencial de redes gliales durante la regeneración del nervio.

Evaluamos también si la Cx43 media la conectividad de la glía envolvente y sostiene la integración de neuronas sensoriales nuevas, utilizando ratones genéticamente modificados para reducir la expresión de Cx43 en la glía envolvente. La reducción de la expresión fue eficiente y selectiva. En estos animales, la glía envolvente mostró menor conductancia de membrana y menor sensibilidad a un bloqueante de *gap junctions*, sugiriendo un acople reducido de la red. Además, estos ratones mostraron reducción en el número de interneuronas positivas para la hidroxilasa de tirosina en el bulbo, parámetro informativo de una entrada sensorial deficiente. En un ensayo olfativo de habituación-deshabitación, estos ratones mostraron reducción en los tiempos de exploración a estímulos olfativos y reducción del número de células positivas para c-fos reclutadas en el bulbo ante estímulos. Estos resultados indican que la Cx43 es necesaria para una función normal del circuito olfatorio.

Esta tesis contribuye al conocimiento sobre propiedades fisiológicas de la glía envolvente y aporta un modelo para identificar mecanismos subyacentes a sus propiedades neurotróficas *in vivo*, de potencial aplicación en terapias neuroregenerativas.

Palabras clave: glía envolvente olfatoria, conexina 43, *gap junctions*, neurogénesis adulta, circuito olfatorio.

Role of connexin 43 in the physiological properties of olfactory ensheathing glia and in the plasticity of the olfactory pathway

Abstract

The olfactory epithelium produces sensory neurons during lifespan, which extend axons throughout the olfactory nerve and establish synapses integrating to the olfactory bulb circuit. This nerve is plastic and regenerates after damage. The sensory axons are associated to olfactory ensheathing glia, believed to underlie the permissiveness for the replacement of olfactory sensory neurons. This is based on the fact that they produce neurotrophic factors and promote axonal growth, *in vitro* and in models of injury. However, the mechanisms underlying the support of axonal growth and the potential participation of ensheathing glia in the maintenance of the olfactory circuit are poorly understood.

The ensheathing glia establish networks mediated by gap junctions, formed by connexins. Gap junctions are essential to support glial functions in other glia types and are remodeled in damage conditions. The ensheathing glia expresses mainly connexin 43 (Cx43), which could participate in nerve maintenance, promoting a coordinated neurotrophin release or through adhesion properties.

We evaluated whether the degeneration/regeneration after damage of the olfactory nerve is associated with plasticity of the associated glial networks. During recovery of the system after damage, we observed a reduced immunoreactivity for Cx43 in the ensheathing glia and an increase in Cx43 immunostaining in the olfactory bulb. This suggests a differential remodeling of the glial networks during nerve regeneration.

We also evaluated whether Cx43 mediates the connectivity of ensheathing glia and supports the integration of new sensory neurons. For this, we used genetically modified mice to reduce Cx43 expression in ensheathing glia. This reduction was efficient and selective. In these animals, the ensheathing glia showed lower membrane conductance and lower sensitivity to a gap junction blocker. This suggests a reduced coupling within the network. Moreover, these mice exhibited a reduction in the number of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the bulb, an informative parameter of sensory input deficiency. In an olfactory habituation-dishabituation test, these mice displayed a reduction in exploration time of olfactory stimuli and a reduction in the number of c-fos-positive cells recruited in the bulb by stimuli. These results indicate that Cx43 is necessary for normal recruitment of olfactory circuits.

This thesis contributes to the knowledge about physiological properties of ensheathing glia and provides a model to identify mechanisms underlying their neurotrophic properties *in vivo*, for potential application in neuroregenerative therapies.

Key words: olfactory ensheathing glia, connexin 43, gap junction, adult neurogenesis, olfactory circuit.

Abreviaturas

ACSF: líquido cefalorraquídeo artificial
AOB: bulbo olfatorio accesorio
BLBP: brain lipid-binding protein
BrdU: bromodeoxyuridina
cCx43KO: knockout condicional de Cx43
Cx30: conexina 30
Cx43: conexina 43
GAP-43: growth associated protein 43
GFAP: glial fibrillary acidic protein
GFP: proteína fluorescente verde
GG: ganglio de Grueneberg
K_{DR}: canales de potasio tipo delayed rectifier
K_{ir}: canales de potasio tipo inward rectifier
MFA: ácido meclofenámico
MMZ: metimazol
MOB: bulbo olfatorio principal
MOE: epitelio olfatorio principal
OMP: olfactory marker protein
PLP: proteo lipid protein
SO: órgano septal
TH: tirosina hidroxilasa
Tx: tamoxifeno
Vh: vehículo
VNO: órgano vomeronasal

Agradecimientos

A Lorena. Por darme un lugar en su laboratorio y por dirigir los momentos fáciles y difíciles de esta tesis. Gracias.

A todos los directores del GNS. Por su continuo apoyo y por todo lo que aportaron a nuestro trabajo. En particular a Juan, por su contribución en los experimentos conductuales de esta tesis y por ayudarnos a todos los becarios del GNS todos los días. Gracias.

A todos mis compañeros del GNS. Por el día a día, por todo lo aprendido juntos y por los momentos compartidos dentro y fuera del labo. Gracias.

A mis doctores favoritos, Ceci y Grego. Porque conocerlos fue encontrarme trabajando con amigos. Ceci gracias por tu inmenso cariño todos estos años, te voy a extrañar mucho.

A mi comisión de seguimiento, Antonia y Fernando. Por su excelente predisposición y su aporte a esta tesis. Gracias.

A mi país y a CONICET. Por financiar esta tesis y permitirme realizar mi carrera. En particular, a la Dra. Claudia Capurro por solidarizarse conmigo. Gracias.

A mis ex-compañeras y amigas del Leloir. Por los momentos compartidos y por haberme ayudado desde sus experiencias científicas y personales a realizar esta tesis. Gracias.

A Germán. Por enseñarme a enfocar mi mente para alcanzar mis objetivos de entrenamiento físico y de vida. Sin el respiro de tus clases, este camino hubiese sido siempre cuesta arriba. Gracias.

A Maris, Paulita y Meli. Por todo, por las intervenciones, y por lo que nos divertimos y sufrimos estos años juntas, siempre juntas. Gracias.

A los chicos. En especial a Juan, Javi, Leoncio y Mati, porque son mis hermanos de la vida y me acompañan siempre, en todos mis recuerdos están y fueron pilares fundamentales en estos y todos mis años. Gracias.

A Lu. Por su cariño, sus pensamientos y la cerveza, claro. Por acompañarme en todas y ser única. Gracias.

A mi familia. Por su continuo apoyo, por cuidarme y soportar todo. En particular a mi mamá, por todo lo que hiciste para que elijamos nuestro camino, por tu esfuerzo y tu respeto. Gracias.

A Álvaro. Por caminar conmigo y aguantarse todo. Por cuidarme todos los días y por ayudarme a confiar en mí y a valorarme, porque sin tu amor no lo hubiese logrado. Creo que no alcanzan las palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mí, pero Gracias.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	8
1. El sistema olfatorio de los mamíferos como modelo para el estudio de la plasticidad de los circuitos nerviosos.....	9
1.1 Estructura y organización anatómico-funcional del sistema olfatorio.....	9
1.1.1 Órganos sensoriales del sistema olfatorio.....	9
1.1.2 El epitelio olfatorio y la detección de los odorantes por las neuronas sensoriales.....	10
1.1.3 Estructura y organización funcional del bulbo olfatorio.....	13
1.2 Neurogénesis en el sistema olfatorio.....	17
1.3 Potencial plástico y regeneración del nervio olfatorio.....	19
2. La glía envolvente olfatoria y su rol en la plasticidad de la vía aferente olfatoria.....	21
2.1 Caracterización fenotípica y comparación con otros tipos gliales.....	22
2.2 Expresión de moléculas de adhesión, factores de crecimiento y neurotrofinas.....	23
2.3 Propiedades regenerativas.....	24
3. La conectividad entre las células gliales y la modulación de la función neuronal	25
3.1 Redes gliales y función neuronal.....	26
3.2 Redes de glía envolvente olfatoria.....	27
3.3 Regulación de las redes gliales en contextos de daño e inflamación.....	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Animales.....	32
2. Genotipificación.....	33
3. Tratamientos administrados a los animales.....	34
3.1 Modelo de daño reversible al epitelio olfatorio: tratamiento con metimazol.....	34
3.2 Knockout condicional de Cx43 en la glía envolvente: tratamiento con tamoxifeno.....	34
3.3 Ensayo de pulso y caza de cohortes de células nuevas: tratamiento con BrdU.....	36
4. Ensayos conductuales.....	36
4.1 Ensayo olfativo de habituación-deshabitación.....	36
4.2 Estimulación olfativa para inducir la activación de c-fos en el bulbo olfatorio...	38

4.3 Ensayo de exploración de una arena abierta (<i>open field</i>).....	38
5. Electrofisiología.....	39
5.1 Obtención de rodajas agudas de bulbo olfatorio para registros electrofisiológicos.....	39
5.2 Registros electrofisiológicos	39
5.3 Análisis de registros electrofisiológicos.....	40
6. Ensayo de captura de bromuro de etidio.....	41
7. Fijación por perfusión intracardíaca.....	41
8. Inmunofluorescencia.....	42
9. Análisis de imágenes.....	44
9.1 Análisis de la inmunoreactividad contra conexinas.....	44
9.2 Análisis de marcadores de células de la glía envolvente.....	45
9.3 Análisis de la inmunoreactividad contra c-fos y TH en el bulbo olfatorio.....	46
9.4 Análisis de la inmunoreactividad contra GAP-43 y OMP en el epitelio olfatorio.....	47
10. Análisis estadístico.....	47
RESULTADOS.....	48
Parte 1: Modulación de conexinas y marcadores biofísicos de conectividad de la glía envolvente durante la degeneración/regeneración inducida al epitelio olfatorio.....	50
1.1 Reproducción del modelo de daño reversible al epitelio olfatorio inducido por el tratamiento con metimazol.....	50
1.2 La degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ se asocia con una reducción en la expresión de Cx43 en la glía envolvente.....	55
1.3 La Cx30 no compensa la reducción en la expresión de Cx43 observa en la capa de las fibras olfatorias por el tratamiento con MMZ.....	58
1.4 La degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ se asocia con el aumento de las células S100B+ en la capa de las fibras olfatorias.....	60
1.5 Regulación positiva de una corriente de membrana activable por despolarización en la glía envolvente durante la degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ.....	61
1.6 La captura de bromuro de etidio por la glía envolvente durante la degeneración/regeneración inducida por MMZ no difiere de la condición control.....	65
Parte 2: La ablación selectiva de conexina 43 en la glía envolvente se asocia con parámetros electrofisiológicos de desconexión.....	68
2.1 El modelo de delección de Cx43 es efectivo y selectivo de la glía envolvente.....	68

2.2 La Cx30 no compensa la reducción en la expresión de Cx43 observada en la capa de las fibras olfatorias de ratones cCx43KO.....	70
2.3 La delección de Cx43 no se asocia con una pérdida de las células de la glía envolvente.....	72
2.4 La delección de Cx43 en la glía envolvente se asocia con una reducción en la corriente de membrana.....	73
2.5 Reducción de la sensibilidad al MFA en las células de la glía envolvente de ratones cCx43KO.....	75
Parte 3: La delección de conexina 43 en la glía envolvente se asocia con la reducción del <i>input</i> sensorial al bulbo y déficits en la percepción de olores.....	78
3.1 Reducción del <i>input</i> sensorial al bulbo en los ratones cCx43KO.....	78
3.2 La delección de Cx43 en la glía envolvente interfiere con la detección de los olores .	79
3.3 Reducción de la inducción de c-fos en interneuronas periglomerulares del bulbo de ratones cCx43KO.....	84
3.4 Reducción de la migración baso-apical de las neuronas sensoriales nuevas en el epitelio olfatorio de ratones cCx43KO.....	86
3.5 La delección de Cx43 no afecta el número total de neuronas inmaduras y maduras del epitelio olfatorio.....	88
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	90
Plasticidad de la glía envolvente durante la degeneración/regeneración del nervio olfatorio.....	91
Rol de la Cx43 en la conectividad de la glía envolvente y en el mantenimiento funcional de la vía aferente olfatoria.....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	98

Introducción

1. El sistema olfatorio de los mamíferos como modelo para el estudio de la plasticidad de los circuitos nerviosos

El sistema olfatorio presenta ventajas para el estudio de los mecanismos que subyacen al desarrollo, la plasticidad y la reparación de los circuitos neuronales, debido a la capacidad de generar continuamente neuronas sensoriales nuevas y de regenerar luego del daño. El reemplazo permanente de las neuronas sensoriales ofrece la oportunidad de estudiar procesos involucrados en su generación, diferenciación e integración durante el mantenimiento del circuito. La capacidad de regenerar luego de un daño permite estudiar un contexto de incorporación masiva y sincronizada de neuronas al circuito, potencialmente diferente del que ocurre durante la renovación normal.

El conocimiento de los mecanismos subyacentes a la integración funcional de neuronas nuevas al circuito olfatorio (ya sea durante el mantenimiento normal o la regeneración masiva posterior al daño), resulta relevante para identificar potenciales estrategias de intervención para conferir plasticidad y capacidad de reparación a los circuitos nerviosos en general.

1.1 **Estructura y organización anatómico-funcional del sistema olfatorio**

1.1.1 **Órganos sensoriales del sistema olfatorio**

Los odorantes del ambiente son detectados por las neuronas sensoriales olfatorias, detectores altamente especializados que se organizan en diferentes estructuras funcionales en la cavidad nasal.

Se distinguen dos sistemas sensoriales principales en la cavidad nasal de los mamíferos: el epitelio olfatorio principal (MOE), cuyas neuronas envían proyecciones al bulbo olfatorio principal (MOB), y el órgano vomeronasal (VNO), cuyas neuronas envían proyecciones al bulbo olfatorio accesorio (AOB) (Breer et al., 2006) (Figura I.1). Mientras el MOE responde a una gran variedad de estímulos químicos, el VNO está mayormente especializado para la identificación de feromonas, moléculas producidas por individuos conespecíficos, implicadas en la modulación de comportamientos como el apareamiento, la lactancia, las señales de peligro y el cortejo (Firestein, 2001). Sin embargo, se ha observado la existencia de cierto solapamiento entre el MOE y el VNO. Se encontraron feromonas que activan neuronas en el MOE, y algunos odorantes generales (de los que se desconoce que actúen como feromonas) que activan el AOB y modulan comportamientos en ausencia del MOE (Su et al., 2009).

Además de los sistemas sensoriales principales, el sistema olfatorio de mamíferos presenta subsistemas que también contienen neuronas sensoriales: el órgano septal (SO) de Masera y el ganglio de Grueneberg (GG) (Figura I.1). El SO es un tejido sensorial aislado del MOE, ubicado a cada lado del *septum* nasal, constituido por una a tres capas de neuronas sensoriales que detectan un amplio rango de estímulos olfativos (Breer et al., 2006; Marshall and Maruniak, 1986). El GG es un ganglio situado bilateralmente en el área rostro-dorsal de la cavidad nasal, en la esquina formada por el *septum* y el techo nasal (Figura I.1). Este ganglio está constituido por neuronas que detectan feromonas y se considera que actúa como un sistema de alarma, reconociendo moléculas que codifican una señal de peligro (Brechtbühl et al., 2008). Las neuronas del SO y del GG proyectan al MOB; las proyecciones del SO se dirigen a la región ventro-medial del MOB, mientras que las proyecciones del GG lo hacen en dirección caudal, hacia una región del MOB conocida como “*necklace glomeruli*” (Breer et al., 2006).

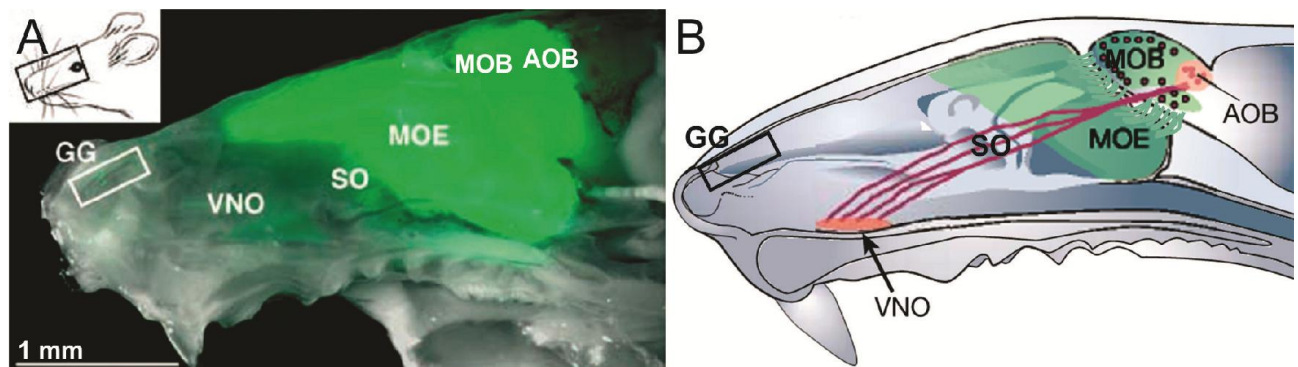


Figura I.1. Anatomía del sistema olfatorio de mamíferos. (A) Sección sagital de la cabeza de un ratón que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor del marcador de neuronas sensoriales maduras *olfactory marker protein*, OMP (OMP-GFP). Se observan el ganglio de Grueneberg (GG), el órgano vomeronasal (VNO), el órgano septal (SO), el epitelio olfatorio principal (MOE), el bulbo olfatorio principal (MOB) y el bulbo olfatorio accesorio (AOB). (B) Representación esquemática de (A). GG, SO y MOE proyectan al MOB, y las neuronas del VNO proyectan al AOB. Adaptado de Brechtbühl et al., 2008 y Firestein, 2001.

A los efectos de esta tesis, nos interesa describir el detalle estructural y funcional del MOE y del MOB. En adelante, epitelio olfatorio se refiere al MOE y bulbo olfatorio al MOB.

1.1.2 El epitelio olfatorio y la detección de los odorantes por las neuronas sensoriales

El epitelio olfatorio y la lámina propia subyacente, constituyen la mucosa nasal que reviste la cavidad nasal (Sullivan et al., 1995). El epitelio contiene neuronas sensoriales bipolares de cuyos cuerpos celulares emerge una dendrita que presenta cilias con la maquinaria molecular asociada a la transducción de la señal olfativa (Elsaesser and Paysan, 2007).

La detección de olores se inicia con la unión de las moléculas de odorante a los receptores olfatorios en la membrana de las neuronas sensoriales (Buck and Axel, 1991). Cada neurona sensorial expresa uno de alrededor de 1000 receptores olfatorios de membrana distintos, que les confiere selectividad de respuesta (Buck and Axel, 1991). Los receptores olfatorios pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Feinstein et al., 2004; O'Dowd et al., 1989) que, luego de la unión del odorante al receptor, activan una cascada de señalización que culmina con la apertura de canales iónicos gatillados por nucleótidos cíclicos (Frings et al., 1991; Nakamura and Gold, 1987) y la despolarización de las neuronas sensoriales (Firestein and Werblin, 1989).

Aunque existen más de 1000 tipos diferentes de receptores olfatorios, se piensa que la detección del enorme repertorio de olores requiere de una estrategia combinatorial (Firestein, 2001). Cada receptor olfatorio puede unirse a un grupo de moléculas de odorante relacionadas y cada molécula de odorante puede unirse a un grupo de receptores olfatorios con diferentes afinidades. La evidencia que apoya esta idea surgió principalmente de estudios mutacionales en *Drosophila*. La eliminación de un receptor olfatorio en *Drosophila* no suprime la respuesta comportamental producida por la detección del odorante (Elmore et al., 2003; Keller and Vosshall, 2007). Inclusive, en un estudio sobre la respuesta a acetato de etilo, se observó que la respuesta a altas concentraciones del odorante dependía principalmente de un receptor olfatorio, y la respuesta a bajas concentraciones dependía de otro (Kreher et al., 2008). Por lo tanto, la representación de un olor radica en la actividad diferencial de la población de receptores olfatorios activados por el olor (Su et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, el epitelio olfatorio tiene la capacidad de generar neuronas nuevas durante toda la vida (Caggiano et al., 1994; Jia et al., 2009; Schwob et al., 1994). Estas se generan a partir de células *stem*/progenitoras localizadas en la zona basal del epitelio (Caggiano et al., 1994). Por su morfología, las células de la capa basal del epitelio, se distinguen en células horizontales y células globosas (Figura 1.2). Las células horizontales permanecen quiescentes durante la adultez, pero luego de un daño masivo al epitelio proliferan y son el reservorio de las células globosas, dando lugar indirectamente a la recuperación del epitelio (Leung et al., 2007). Se considera que las células globosas son responsables de la generación de neuronas nuevas durante el recambio normal de las neuronas sensoriales (Caggiano et al., 1994).

La zona basal del epitelio se continúa en sentido apical con una capa intermedia, constituida por las neuronas sensoriales en distintos estadios de maduración. Las neuronas sensoriales inmaduras, comúnmente identificadas por la expresión de *growth-associated protein 43* (GAP43) y Tuj1, tienen una ubicación más basal en la capa intermedia del epitelio (Beites et

al., 2005; Leung et al., 2007). Hacia la región apical, se encuentran las neuronas sensoriales maduras, frecuentemente identificadas por la expresión de *olfactory marker protein* (OMP) (Jia et al., 2009; Rodríguez-Gil et al., 2015). Finalmente, en la zona más apical del epitelio se ubican las células sustentaculares de soporte.

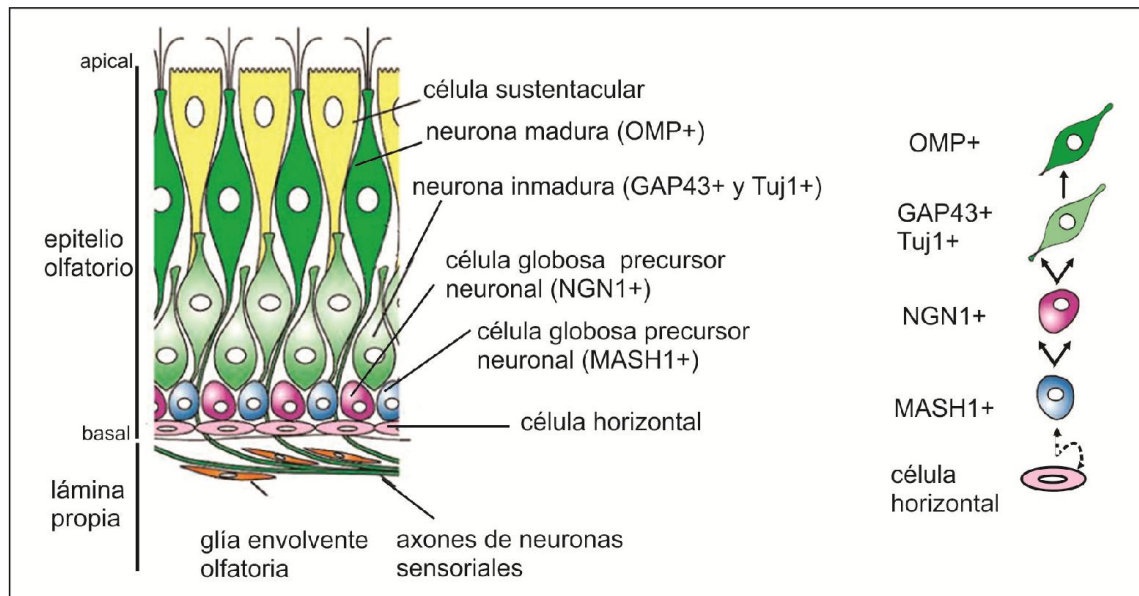


Figura I.2. Esquema de la vía de diferenciación neuronal y de la disposición histológica de las células en el epitelio olfatorio adulto. (Izquierda) Ubicación de los tipos celulares en el epitelio olfatorio y la lámina propia. **(Derecha)** Tipos celulares que se identifican en el linaje neuronal del proceso de diferenciación del epitelio olfatorio. Durante el recambio normal del epitelio, las células globosas, positivas para los marcadores MASH1 y NGN1, proliferan. Aquellas que tienen un destino neuronal (NGN1+) dan lugar a las neuronas sensoriales inmaduras (GAP43+ y Tuj1+), que luego maduran (OMP+). En la zona basal del epitelio, las células horizontales se mantienen mayormente quiescentes. La línea punteada indica que estas células son capaces de proliferar luego del daño al nervio. Adaptado de Beites et al., 2005.

La maduración de las neuronas sensoriales olfatorias involucra el crecimiento de un axón, que se extiende desde el epitelio olfatorio, en la periferia, hasta el sistema nervioso central, dónde forma sinapsis en el bulbo olfatorio (Graziadei and Graziadei, 1979). Tanto a nivel de la lámina propia adyacente al nicho neurogénico del epitelio, como en su recorrido hacia el bulbo olfatorio, los axones de las neuronas sensoriales están acompañados por un tipo de glía especializada, la glía envolvente olfatoria (Au et al., 2002; Doucette, 1984) (Figura I.2 e I.3). A diferencia de lo observado en otros nervios periféricos, la transición del sistema periférico al central no se distingue por un cambio dramático en el tipo de glía asociada a las neuronas (células de Schwann, versus oligodendrocitos o astrocitos, respectivamente) (Doucette, 1991; Fraher, 2000). Esta característica junto con propiedades neurotróficas de la glía envolvente olfatoria que serán discutidas en detalle más adelante, sugieren que esta glía sostiene la permisividad para el crecimiento axonal y la eficiente invasión al sistema nervioso central de los axones sensoriales durante el recambio de las neuronas sensoriales (Doucette, 1990; Ramón-Cueto and Valverde, 1995).

1.1.3 Estructura y organización funcional del bulbo olfatorio

La información de las neuronas sensoriales activadas por un odorante es transmitida al bulbo olfatorio, el primer relevo de la vía. El bulbo olfatorio es una estructura laminar, con tipos celulares específicos de cada capa, que se describen a continuación (Price and Powell, 1970) (Figura I.3).

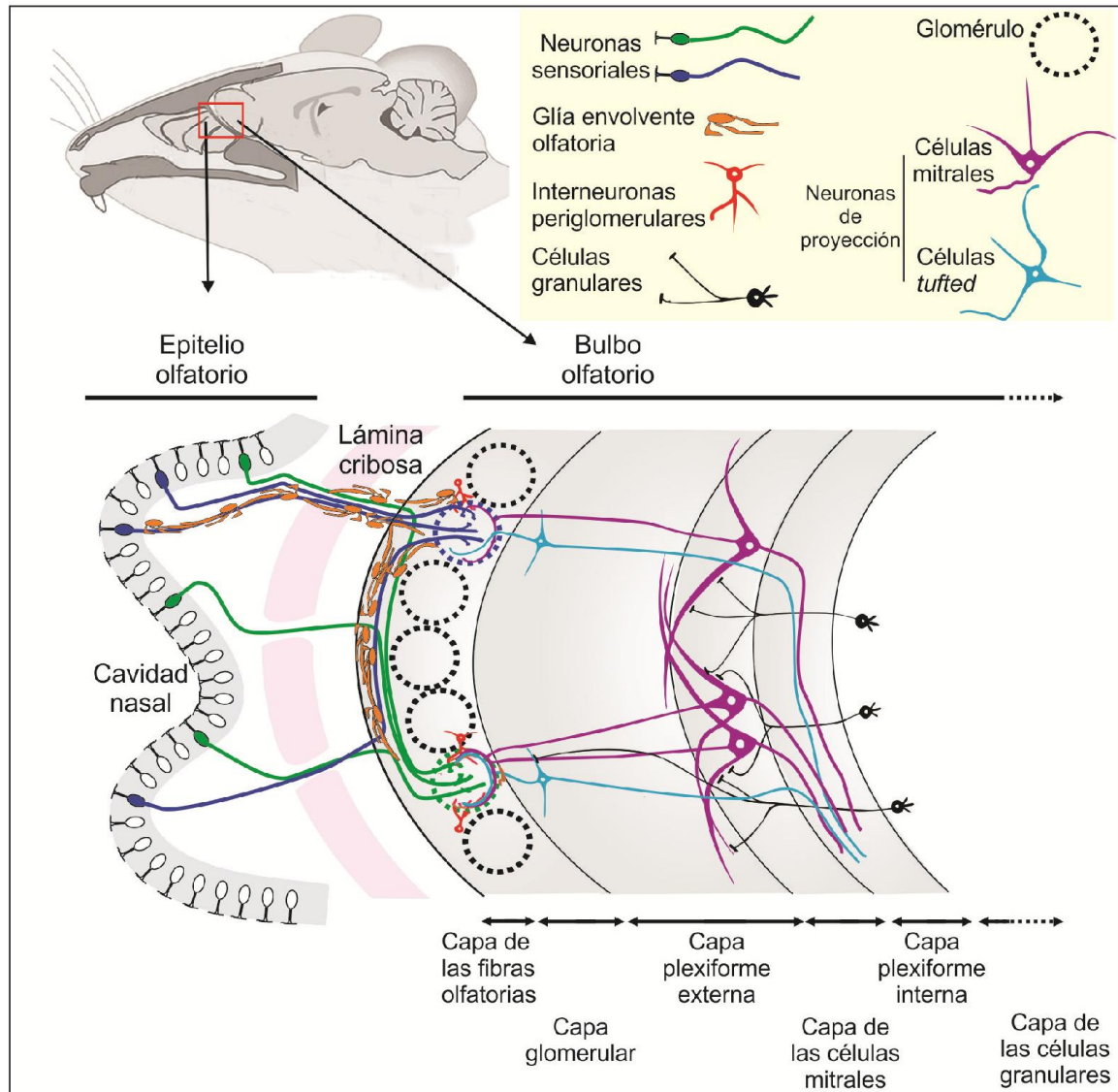


Figura I.3. Esquema de la estructura laminar y la composición celular del bulbo olfatorio. Tipos celulares principales y contactos sinápticos que identifican cada capa. Las neuronas sensoriales que expresan un mismo receptor, representado por el color, realizan sinapsis en un neuropilo específico. Adaptado de Nagayama et al., 2014 y Locatelli and Relu, 2014.

La **capa de las fibras olfatorias** contiene los tramos terminales de los axones de las neuronas sensoriales, que llegan al bulbo e inervan blancos específicos en la capa glomerular (Figura I.3). En estrecha relación con estos axones, se ubican las células de la glía envoltora olfatoria (Doucette, 1984). Esta glía especializada constituye la mayoría de los cuerpos celulares presentes en esta capa (Au et al., 2002), mientras que en baja proporción se observan astrocitos

(Au et al., 2002; Valverde and Lopez-Mascaraque, 1991) y microglía (Kosaka et al., 2009; Wu et al., 1997).

La **capa glomerular** contiene los glomérulos, neuropilos aproximadamente esféricos de 50 μm de diámetro promedio, donde convergen los axones de las neuronas sensoriales olfatorias, las dendritas de las neuronas proyección (células mitrales y *tufted*) y neuritas de interneuronas, y proyecciones de células gliales, principalmente astrocitos (Pinching and Powell, 1971) (Figura I.3).

Siguiendo el principio de proyección “zona a zona” (Mori et al., 1999), la topografía espacial del epitelio nasal es preservada en la capa glomerular. Las paredes laterales de la cavidad nasal tienen repliegues denominados turbinas tapizados por epitelio olfatorio (Barrios et al., 2014; Liebich, 1975) (Figura I.4 A y B). De acuerdo con la distribución de la expresión de receptores olfatorios en estas estructuras, se determinaron zonas que revelan una organización topográfica de neuronas en la cavidad nasal (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993). Los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales que expresan un mismo receptor olfatorio no guardan una relación de proximidad estricta, sin embargo sus axones convergen en uno o dos glomérulos por bulbo, de localización conservada, según el receptor olfatorio expresado, otorgando innervación homogénea a cada glomérulo (Figura I.3) (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994). Así la señal de los odorantes recibida en el epitelio olfatorio es convertida en un mapa topográfico de actividad glomerular en el bulbo (Feinstein and Mombaerts, 2004; Miyamichi, 2005; Wang et al., 1998) (Figura I.4.C).

Las neuronas sensoriales hacen sinapsis con interneuronas, y neuronas de proyección cuyos cuerpos celulares no están presentes en la capa glomerular (a excepción de algunas neuronas *tufted*), sin embargo sus dendritas apicales se proyectan y asocian a un glomérulo particular (Macrides and Schneider, 1982; Yan et al., 2008) (Figura I.3). La convergencia de las neuronas sensoriales y la asociación de las neuronas de proyección con glomérulos únicos, sugieren que cada glomérulo es una unidad anatómica y funcional.

Los mecanismos involucrados en la fasciculación y la convergencia de los axones no se encuentran completamente aclarados, aunque existen evidencias que involucran a moléculas guía (*guidance cues*) (Alenius and Bohm, 2003; Col et al., 2007; Wang et al., 1998), moléculas de adhesión (Alenius and Bohm, 2003), señalización mediada por AMPc (Col et al., 2007; Imai et al., 2006) y al receptor olfatorio mismo (Feinstein et al., 2004; Wang et al., 1998). Los receptores olfatorios se localizan también en los procesos axonales de las neuronas sensoriales, lo cual es consistente con su rol en la fasciculación de los axones hacia el bulbo olfatorio (Schwarzenbacher et al., 2005).

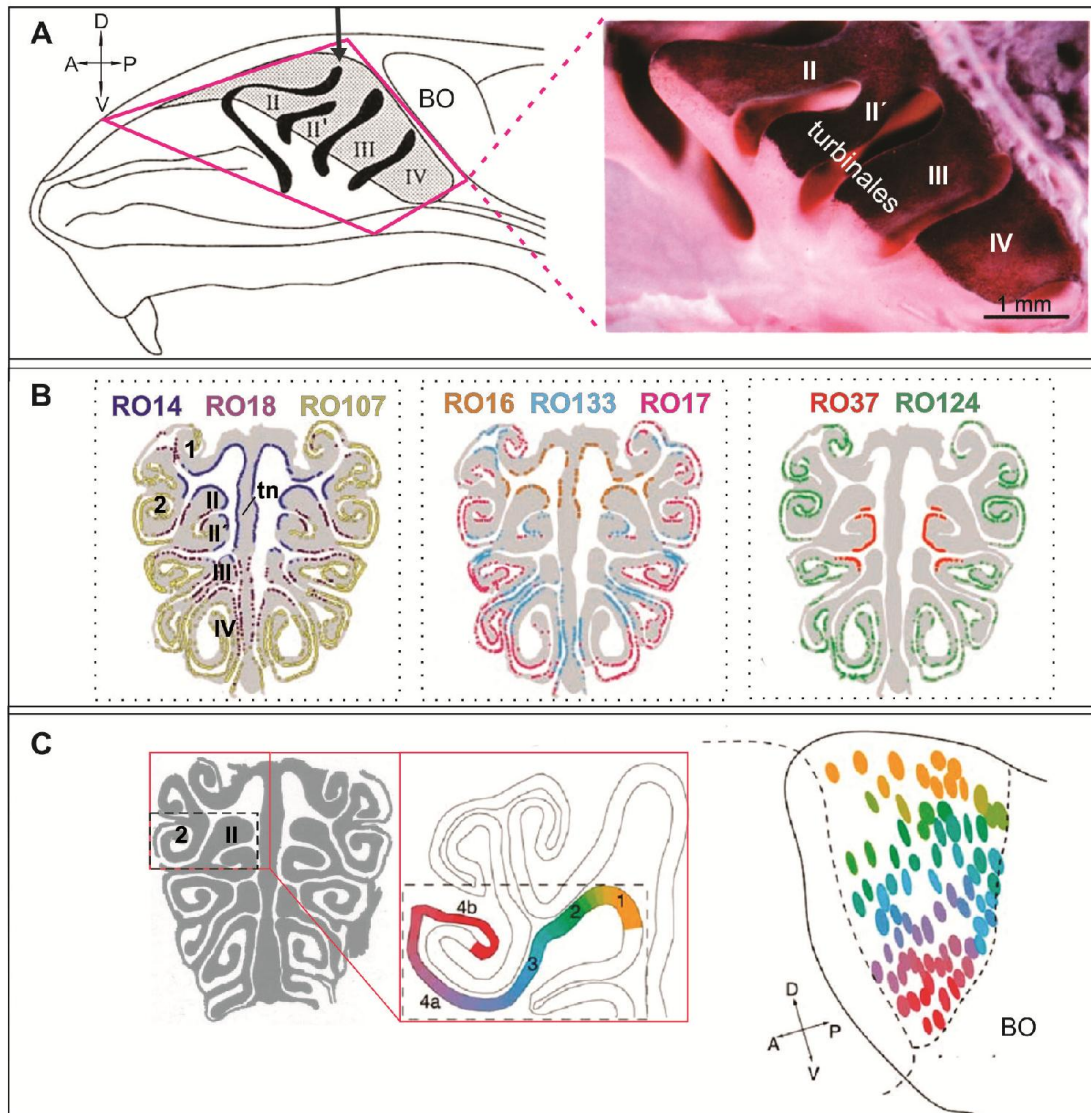


Figura 1.4. Organización topográfica del mapa sensorial olfatorio. (A) Izquierda: esquema de la cavidad nasal y del sistema de turbinales de un ratón adulto, en vista lateral. Se indican los endoturbinales (II, II', III y IV) y se representa el epitelio olfatorio sensorial en gris. BO: bulbo olfatorio. La flecha indica la coordenada anteroposterior de las secciones representadas en B. Derecha: vista medial de la cavidad nasal, luego de remover el tabique nasal e hibridación *in situ* con el marcador de neuronas sensoriales olfatorias, OMP. (B) Esquemas representando los patrones de expresión para algunos receptores olfatorios en secciones coronales de epitelio olfatorio. Se indican los ectoturbinales (1 y 2) y los endoturbinales (II, II', III y IV) y el tabique nasal (tn). RO: receptor olfatorio. (C) Correspondencia entre la localización de los somas de neuronas sensoriales en el epitelio y sus proyecciones axonales en el bulbo. Se definen zonas en el epitelio (recuadro) según el repertorio de receptores olfatorios que expresan sus neuronas sensoriales. Adaptado de Iwema et al., 2004; Miyamichi, 2005 y Vassar et al., 1993.

Las interneuronas periglomerulares (ubicadas rodeando los glomérulos) modulan el *input* sináptico y la actividad de las neuronas de proyección, y no necesariamente se encuentran asociadas a un mismo glomérulo (Schoppa and Urban, 2003). Estas se clasifican según los neurotransmisores que liberan (GABA o dopamina) y la expresión de proteínas de unión a calcio, particularmente calbindina, calretinina y parvalbúmina (Whitman and Greer, 2007). Uno de los subtipos que expresa marcadores GABAérgicos (isoformas de la enzima limitante de la síntesis de

GABA, ácido glutámico decarboxilasa, GAD65 y GAD67) y dopaminérgicos (la enzima limitante en la síntesis de dopamina, la tirosina hidroxilasa, TH), es de particular interés por ser sensible al *input* sensorial y a la denervación. Esto se pone de manifiesto mediante una reducción de su número y de la expresión de TH en condiciones de privación sensorial (Figura I.5) y denervación del bulbo olfatorio (Baker, 1990; Kawamoto et al., 2003; Sawada et al., 2011).

Las interneuronas periglomerulares cercanas a los glomérulos que responden a un odorante se activan (Bautze et al., 2012, 2014). El análisis de la expresión del mensajero y la proteína c-fos, cuyo aumento identifica la activación neuronal reciente (Morgan et al., 1987), permitió estudiar el mapa de activación del circuito olfatorio en respuesta a un odorante (Guthrie and Gall, 1995; Guthrie et al., 1993) (Figura I.5).

Tanto la expresión de c-fos como de TH por subpoblaciones de neuronas periglomerulares, son parámetros sensibles del *input* sensorial que llega al bulbo y constituyen herramientas útiles para evaluar funcionalmente al circuito olfatorio bulbar.

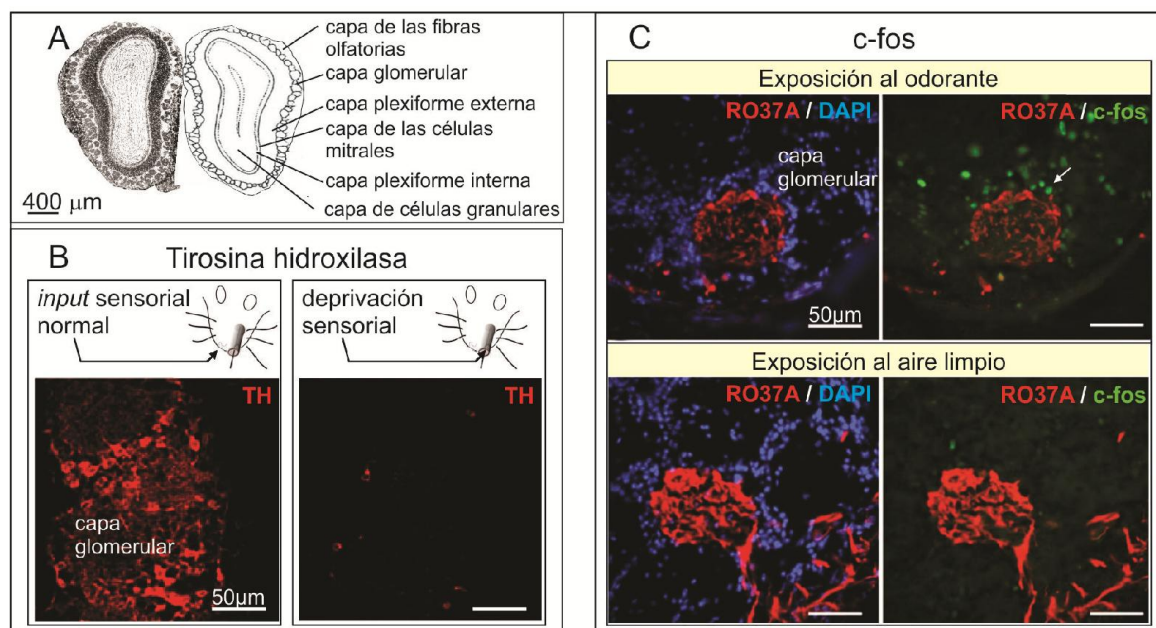


Figura I.5. Parámetros sensibles al *input* sensorial al bulbo olfatorio. (A) Sección coronal y esquema del bulbo indicando sus láminas. (B) La privación sensorial por oclusión de una narina se asocia con una reducción en la expresión de TH (en rojo) por las neuronas periglomerulares del bulbo. (C) Expresión de c-fos (en verde) por las neuronas periglomerulares del glomérulo inervado por neuronas sensoriales que expresan el receptor 37A (en rojo). Luego de la exposición al odorante, se observa la activación de las interneuronas periglomerulares (señaladas con la flecha). Adaptado de Bautze et al., 2012; y Sawada et al., 2011.

La **capa plexiforme externa** está ocupada por las sinapsis dendro-dendríticas de las neuronas de proyección, y de las interneuronas granulares (Figura I.3). En esta capa se ubican además, algunas neuronas de proyección *tufted* e interneuronas Gabaérgicas, principalmente

calreninina-positivas, TH-positivas ó parvalbúmina-positivas (Briñón et al., 1999; Liberia et al., 2012; Miyamichi et al., 2013).

La activación de neuronas de proyección produce la liberación de glutamato de sus dendritas laterales. Esto activa a las interneuronas granulares, que a su vez inhiben a las de proyección mediante mecanismos de inhibición recurrente y lateral (Xiong and Chen, 2002). Estos mecanismos contribuyen al aumento del contraste en los patrones de activación de diferentes olores y modulan la salida de la información sensorial a las estructuras superiores en la corteza olfatoria, vía las neuronas de proyección del bulbo (Nagayama et al., 2014).

La **capa de las células mitrales** contiene los cuerpos celulares de las neuronas de proyección mitrales (Figura I.3).

La **capa plexiforme interna** contiene los axones de las neuronas de proyección que forman el tracto olfatorio lateral hacia estructuras de procesamiento superior en la corteza olfatoria (Igarashi et al., 2012; Nagayama, 2010).

La **capa de las células granulares** está compuesta principalmente por las neuronas granulares mencionadas anteriormente, GABAérgicas y carentes de axón (Nagayama et al., 2014) (Figura I.3). En contraste a las interneuronas periglomerulares, las células granulares son molecularmente menos diversas. De los marcadores utilizados para clasificar a las interneuronas periglomerulares únicamente se identificó la expresión de calretinina por una parte de las células granulares, de ubicación más superficial en la capa (Batista-Brito et al., 2008).

En estudios con trazadores virales se observó que esta capa presenta una estructura columnar y se propuso que estas columnas representan una extensión de las unidades glomerulares (Willhite et al., 2006).

1.2 **Neurogénesis en el sistema olfatorio**

La neurogénesis se define como la capacidad de generar neuronas nuevas funcionales, a partir de precursores neurales (Ming et al., 2005). Se compone de diferentes etapas: la proliferación de los precursores, su diferenciación hacia un linaje neuronal, la maduración morfológica y fisiológica de las neuronas nuevas para convertirse en neuronas funcionales integrales del circuito, y su supervivencia (Lledo et al., 2006).

Como se mencionó, el sistema olfatorio de los mamíferos conserva la capacidad de producir neuronas nuevas durante toda la vida adulta. La neurogénesis en el sistema olfatorio ocurre tanto a nivel del sistema nervioso central, como en la periferia.

La neurogénesis periférica ocurre en el epitelio olfatorio a partir de las células precursoras que residen en la zona basal de este epitelio (Figura I.6 A). El linaje de las células precursoras se detalló al describir los componentes celulares del epitelio olfatorio en la sección anterior. La vida media de las neuronas sensoriales ronda las pocas semanas y sufren un reemplazo permanente (Caggiano et al., 1994; Graziadei and Graziadei, 1979; Whitman and Greer, 2007). Su maduración involucra el crecimiento de un axón, desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo olfatorio y la formación de sinapsis con neuronas de proyección e interneuronas (Pinching and Powell, 1971; Shepherd, 1972). En numerosos estudios se identificaron las células en división y su progenie y se analizaron los perfiles espacio-temporales de la expresión de marcadores del estadio de maduración neuronal de las neuronas sensoriales nuevas (Caggiano et al., 1994; Jia et al., 2009; Leung et al., 2007; Schwob et al., 1994). En un estudio reciente se observó que en ratones de 7 días, las neuronas nuevas expresan el marcador de neuronas maduras OMP, y sus axones, alcanzan la capa glomerular del bulbo después de 6 y 8 días desde el marcaje de sus progenitores en división, respectivamente (Rodríguez-Gil et al., 2015) (Figura I.6 B). Aunque no se mapeó *in vivo* la extensión de los axones de las neuronas sensoriales nuevas en ratones adultos, en otros estudios se reporta que en éstos las neuronas nuevas continúan siendo fenotípicamente inmaduras (OMP-) a los 9 días desde su nacimiento, mientras que a los 16 días presentan el fenotipo maduro (OMP+) (Jia et al., 2009). Estos resultados, junto con otros (Brann et al., 2015; Suzukawa et al., 2011), sugieren que la maduración de las neuronas nuevas en ratones adultos, podría demorar 10-30 días desde su nacimiento.

Por otra parte, la neurogénesis central produce precursores neuronales en la zona subventricular (adyacente a la pared de los ventrículos laterales), que migran a lo largo de la corriente migratoria rostral (Figura I.6 A) y se diferencian e incorporan como interneuronas inhibitorias en los circuitos del bulbo olfatorio, principalmente interneuronas periglomerulares y granulares (Carleton et al., 2003). Mientras las interneuronas granulares nuevas adquieren una morfología de célula madura a los 15 días desde su nacimiento, (exhibiendo una compleja arborización dendrítica que se extiende en la capa plexiforme externa), las células periglomerulares demoran alrededor de 28 días en madurar (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002) (Figura I.6 C).

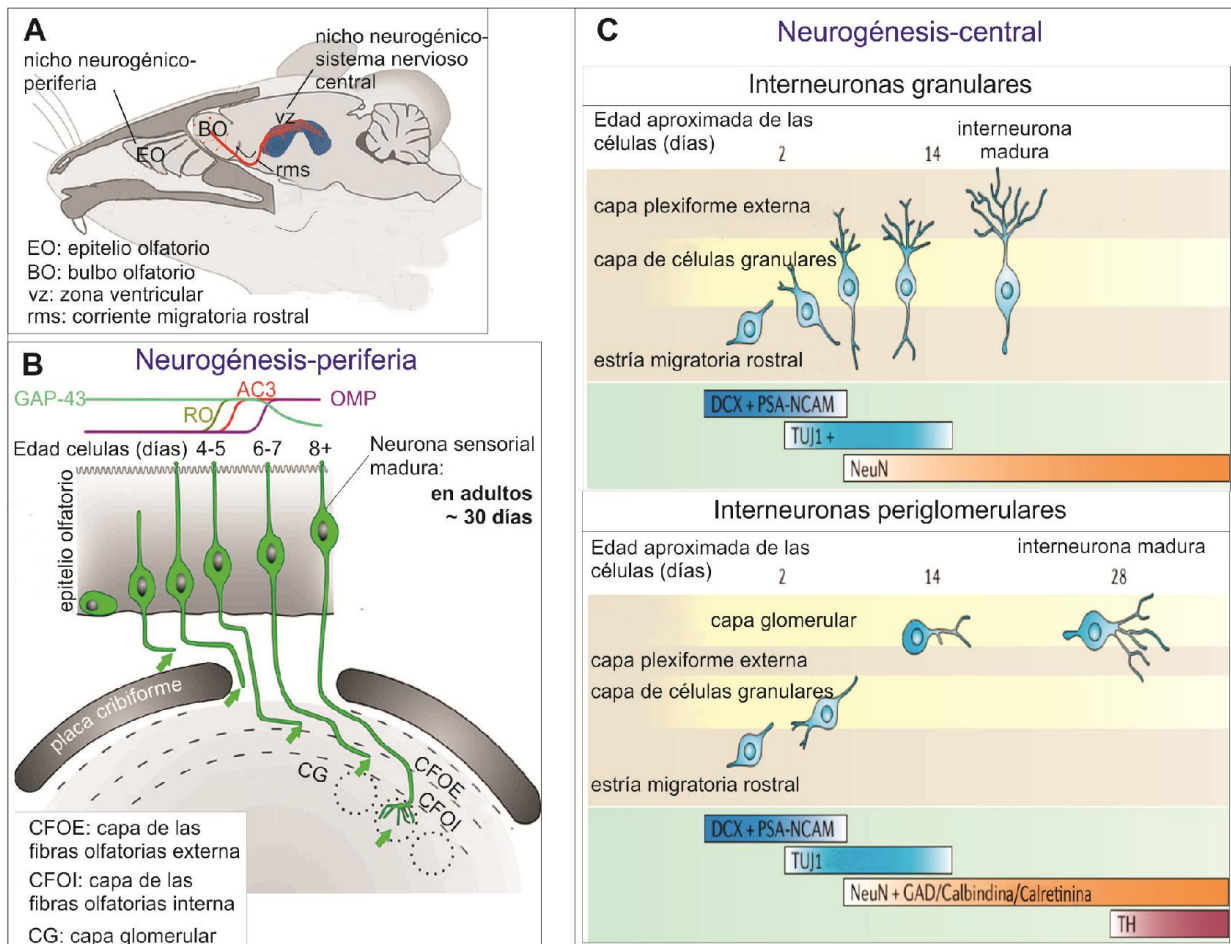


Figura 1.6. Maduración post-mitótica de las neuronas nuevas derivadas de los nichos neurogénicos del sistema olfatorio. (A) Esquema de un corte sagital de la cabeza de un ratón, indicando los nichos neurogénicos del sistema olfatorio. (B) Diferenciación de las neuronas sensoriales olfatorias nuevas durante el desarrollo postnatal. Se indican los perfiles temporales para la expresión de GAP-43 (marcador de neuronas inmaduras), RO (receptores olfatorios), AC3 (enzima adenilato ciclasa III, implicada en la transducción de las señales olfatorias) y OMP (marcador de neuronas maduras). (C) Diferenciación de las interneuronas derivadas del nicho neurogénico adyacente a la pared de los ventrículos laterales en el sistema nervioso central de ratones adultos. Se indica el progreso fenotípico desde el nacimiento hasta la maduración de las interneuronas granulares y periglomerulares. DCX, PSA-NCAM y Tuj1 (marcadores de neuronas inmaduras); NeuN, GAD, Calbindina, Calretinina y TH (marcadores de neuronas maduras). Adaptado de Lledo et al., 2006 y Rodríguez-Gil et al., 2015.

El sistema olfatorio brinda la oportunidad única de estudiar los mecanismos involucrados en la formación de un circuito, ya que su organización en unidades anatómico-funcionales facilita el estudio de las conexiones sinápticas, y el reemplazo permanente de las neuronas sensoriales, permite estudiar los mecanismos involucrados en el cableado específico del circuito.

1.3 Potencial plástico y regeneración del nervio olfatorio

Las neuronas sensoriales olfatorias son vulnerables al potencial tóxico del ambiente debido a que se encuentran expuestas a este. La permanencia de progenitores en el epitelio olfatorio

capaces de reemplazar las neuronas sensoriales perdidas, permite preservar el sentido del olfato (Farbman, 1990). Debido a que la muerte y el reemplazo de las neuronas sensoriales son eventos acoplados (Costanzo and Graziadei, 1983; Schwob et al., 1992), durante la deprivación sensorial por la oclusión de las narinas, la vida media de las neuronas sensoriales se incrementa y se observa la reducción del recambio neuronal y de la división celular de los progenitores neurales del epitelio (Farbman et al., 1988). Aunque la deprivación sensorial se asocie con cambios en el recambio del epitelio, la demostración del potencial plástico del sistema proviene de modelos de daño al nervio olfatorio, seguidos por su posterior regeneración. El curso temporal y el patrón de reemplazo de las neuronas sensoriales difiere entre los modelos de daño al nervio, dependiendo del tipo de muerte celular y del grado de extensión de la lesión inducida (Carter et al., 2004).

Entre los modelos de daño al nervio olfatorio, se utilizaron lesiones quirúrgicas, tales como la remoción quirúrgica del bulbo (bulbectomía) o el seccionamiento del nervio olfatorio (axotomía) (Costanzo, 1984; Graziadei and Graziadei, 1979; Harding et al., 1977), y lesiones químicas, dónde el epitelio olfatorio se daña por el tratamiento con compuestos químicos de efecto nocivo. Entre las lesiones químicas se utilizaron detergentes (Bronshteín and Minor, 1977), sulfato de zinc (ZnSO_4) (Harding et al., 1978), gas bromuro de metilo (MeBr) (Schwob et al., 1995) y la administración intraperitoneal del herbicida diclobenil (Bergman et al., 2002) o de la droga anti-tiroidea metimazol (Bergström et al.). En todos estos modelos se demostró la inducción de muerte celular en el epitelio olfatorio y la posterior regeneración, recuperando la vía aferente olfatoria.

El modelo de daño inducido por metimazol presenta la ventaja de haber sido bien caracterizado en cuanto a los procesos metabólicos que determinan el efecto secundario olfatotóxico de esta droga y el curso temporal de la recuperación del epitelio. La metabolización del metimazol en el epitelio olfatorio es dependiente de la enzima microsomal CYP2A5, de la superfamilia del citocromo P450, abundante en la mucosa nasal (Piras et al., 2003; Xie et al., 2011). La degeneración de las neuronas sensoriales olfatorias inducida por metimazol, ocurre principalmente por apoptosis, mediada por la liberación mitocondrial de citocromo c y la activación de caspasa-3 (Sakamoto et al., 2007).

Después de 5 días de la administración de metimazol, se observan cambios histopatológicos asociados al proceso de degeneración del epitelio (Figura I.7 A). Este presenta un espesor delgado, una estructura desorganizada, y se distinguen escasas células positivas para los marcadores de neuronas inmaduras GAP-43 y Tuj1 (Bergman et al., 2002) y la ausencia de células positivas para el marcador de neuronas maduras OMP (Kikuta et al., 2015). Por el contrario, a los 15 días luego de la administración de metimazol, el progreso fenotípico del epitelio se asocia con el proceso de regeneración (Figura I.7 B). Se observa el aumento de la organización y del espesor del epitelio, constituido principalmente por abundantes neuronas

inmaduras y escasas neuronas maduras (Bergman et al., 2002; Suzukawa et al., 2011). Durante este proceso de regeneración, se observa una tasa exacerbada de proliferación celular (Suzukawa et al., 2011) (Figura I.7 B).

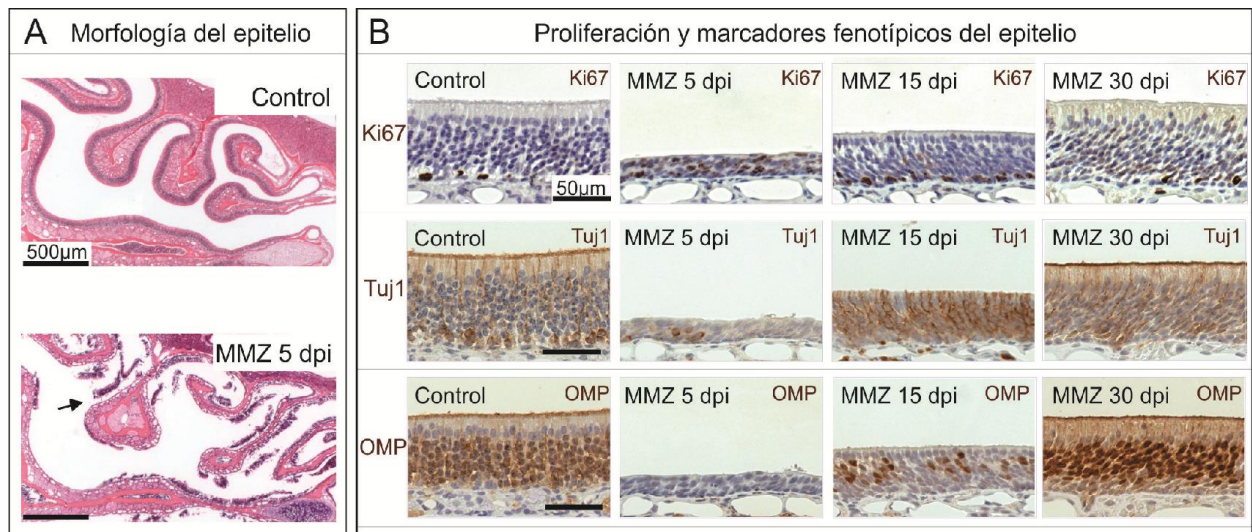


Figura I.7. Modelo de daño reversible al nervio olfatorio inducido por metimazol. (A) Tinción con hematoxilina-eosina de la mucosa olfatoria de un ratón adulto tratado con salina (control) o metimazol (MMZ) a los 5 días post inyección (dpi). La flecha en el panel inferior señala el desprendimiento del neuroepitelio. **(B)** Curso temporal de la expresión del marcador de proliferación celular (Ki67), el marcador de neuronas inmaduras (Tuj1) y el marcador de neuronas maduras (OMP) en el epitelio olfatorio adulto, luego de 5, 15 y 30 días después de la administración de metimazol. Adaptado de Suzukawa et al., 2011.

Finalmente, la recuperación estructural y fenotípica del epitelio se alcanza entre los 30 y los 45 días luego de la administración de metimazol (Blanco-Hernández et al., 2012; Kikuta et al., 2015) (Figura I.7 B).

La degeneración de la mucosa olfatoria por el tratamiento con metimazol se asocia con hiposmia transiente (Blanco-Hernández et al., 2012; Genter et al., 1996; Xu and Slotnick, 1999), recuperándose la función olfativa a los 30-45 días de la lesión. La organización topográfica de neuronas sensoriales en el bulbo se recupera luego del daño, lo cual le confiere al sistema olfatorio adulto una característica única entre los sistemas sensoriales (Cheung et al., 2013).

2. La glía envolvente olfatoria y su rol en la plasticidad de la vía aferente olfatoria

La glía envolvente olfatoria se encuentra asociada a los axones de las neuronas sensoriales olfatorias en toda su extensión, desde la lámina basal del epitelio, hasta el bulbo olfatorio y se la considera un tipo de glía especializado.

En estudios *in vitro* y en modelos de daño a la médula espinal, se demostró que la glía envolvente promueve el crecimiento axonal y expresa moléculas de adhesión y factores neurotróficos de efecto conocido sobre la neurogénesis en otros nichos neurogénicos. Estas propiedades, en conjunto con su organización anatómica, en estrecha relación con los axones de las neuronas sensoriales, sugieren que esta glía especializada constituye el entorno permisivo que subyace a la plasticidad del nervio olfatorio.

El trasplante de células de la glía envolvente en regiones lesionadas del sistema nervioso constituye una terapia prometedora para promover la neuro-reparación. Sin embargo, el desarrollo de terapias efectivas depende de la determinación de los mecanismos moleculares y celulares, mediante los cuales la glía envolvente olfatoria potencialmente sostiene la plasticidad y reparación de la vía aferente olfatoria.

2.1 **Caracterización fenotípica y comparación con otros tipos gliales**

Las células de la glía envolvente derivan de la cresta neural, y por lo tanto comparten una herencia común en su desarrollo con las células de Schwann (Barraud et al., 2010). Originalmente, se conocían como las células de Schwann del sistema olfatorio (Doucette, 1984), pero debido a sus características únicas, se separaron del resto de las células gliales, al punto de ser consideradas un tipo de glía especializada (Ramón-Cueto and Valverde, 1995).

Las células de la glía envolvente constituyen una población heterogénea dependiendo de su localización y expresan diferentes marcadores gliales encontrados en las células de Schwann y los astrocitos. Las células de la glía envolvente ubicadas en la lámina propia del epitelio olfatorio, expresan típicamente el marcador del receptor de baja afinidad de neurotrofina p75, la proteína de unión a calcio S100B, y la proteína de filamentos intermedios *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Au and Roskams, 2003). El marcador S100B es expresado por todas las células de Schwann (Zuo et al., 2004), pero únicamente las células de Schwann no-mielinizantes y las que se desdiferencian luego de una injuria, expresan los marcadores p75 y GFAP (Jessen et al., 1990; Taniuchi et al., 1988; Triolo et al., 2006). Por otra parte, los astrocitos expresan típicamente el marcador GFAP, aunque también pueden expresar S100B (Raponi et al., 2007). Al igual que en las células de Schwann, la expresión de p75 en los astrocitos es inducida luego de un daño y se asocia con un incremento de la apoptosis astrogliar, sugiriendo el rol de este receptor en la regulación de la astrogliosis tras la injuria (Cragnolini et al., 2009; Ibáñez and Simi, 2012).

En la capa de las fibras olfatorias del bulbo, la glía envolvente presenta una organización sublamina. En la capa externa, más superficial, esta glía expresa altos niveles del marcador p75

y bajos niveles del marcador GFAP, mientras que en la capa interna presenta el patrón inverso (Au et al., 2002). Por otra parte, S100B se expresa en niveles similares en ambas capas.

Otro marcador de las células de la glía envolvente, es la proteína *brain lipid binding protein* (BLBP), expresada por la glía radial (Murdoch and Roskams, 2008). Esta proteína es regulada negativamente en la mayoría de las células del sistema nervioso maduro, pero puede ser regulada positivamente luego de un daño (Miller et al., 2003).

Si bien la glía envolvente no produce mielina, expresa *proteo lipid protein* (PLP) (Dickinson et al., 1997; Timsit et al., 1995), el componente más abundante de la mielina del sistema nervioso central (Michalski et al., 2011).

La expresión concomitante de este amplio grupo de marcadores gliales en la glía envolvente olfatoria, sugiere que esta glía especializada retiene luego del desarrollo un fenotipo plástico. Inclusive, se observó que las células de la glía envolvente comparten ciertas propiedades con las células de la microglía del sistema inmune, que eliminan los restos celulares del sistema nervioso. En el sistema olfatorio se observó *in vivo* (Su et al., 2013) e *in vitro* (Lankford et al., 2008; Wewetzer et al., 2005) que las células de la glía envolvente fagocitan los restos de las neuronas en degeneración.

Las células de la glía envolvente olfatoria presentan una morfología alargada y aplanada, con proyecciones citoplasmáticas que forman una matriz con lagunas por donde discurren los paquetes axonales de las neuronas sensoriales (Doucette, 1984; Rela et al., 2010; Valverde and Lopez-Mascaraque, 1991). La estructura tridimensional de la glía envolvente se mantiene intacta incluso luego de la degeneración de las neuronas sensoriales inducida por una axotomía, sugiriendo que la matriz glial sostiene la regeneración del nervio olfatorio (Li et al., 2005).

2.2 **Expresión de moléculas de adhesión, factores de crecimiento y neurotrofinas**

Las células de la glía envolvente expresan una serie de moléculas de adhesión y componentes de la matriz extracelular que favorecen la supervivencia neuronal, la iniciación de las neuritas, la extensión de los axones y participan en la guía axonal (*axon guidance*) (Yang et al., 2015). Entre las proteínas de adhesión, se incluyen: galectina-1, laminina, L1, N-CAM, fibronectina y colágeno IV (Doucette, 1996; Franceschini and Barnett, 1996). De las moléculas de la matriz extracelular, se distinguen la metaloproteinasa-2 (MMP-2), asociada con la regeneración

y la iniciación de los axones (Pastrana et al., 2006), y el precursor de proteína amiloide (APP), que favorece la extensión axonal (Moreno-Flores et al., 2003).

Además, la glía envolvente presenta la capacidad de producir factores de crecimiento, tales como *fibroblast growth factor* (FGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), y neurotrofinas, tales como *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), neurotrofina 3 y 4/5 (NT-3 y NT-4/5), *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) y *nerve growth factor* (NGF) (Chuah and Teague, 1999; Doucette, 1990; Kafitz and Greer, 1999; Ramón-Cueto et al., 1993; Tisay and Key, 1999; Woodhall et al., 2001; Xu et al., 1995). A pesar de que la mayor parte de los estudios sobre la expresión de neurotrofinas y factores de crecimiento en la glía envolvente se realizaron *in vitro* o en transplantes, se propone que durante el mantenimiento de la vía aferente olfatoria, esta glía promueve el crecimiento axonal a través de la liberación concertada de factores neurotróficos y la formación de un sustrato celular con moléculas de adhesión, que facilitan la migración y la extensión de los axones (Boruch et al., 2001; Chuah et al., 2004; Chung et al., 2004; Tisay and Key, 1999).

2.3 Propiedades regenerativas

De acuerdo con su potencial neurotrófico, durante la última década las células de la glía envolvente se han considerado como una fuente para el desarrollo de terapias regenerativas del sistema nervioso, especialmente del daño a la médula espinal. Uno de los objetivos principales en el tratamiento posterior al daño a la médula espinal, es la recuperación de un entorno permisivo para el crecimiento axonal. En este sentido, el trasplante de células de la glía envolvente resulta prometedor, ya que cuando éstas son trasplantadas al sitio de injuria en la médula espinal, interactúan libremente con los procesos astrocíticos que forman la cicatriz glial (Chuah et al., 2011; Lakatos et al., 2000). Inclusive, se observó que las células de la glía envolvente migran desde los sitios dónde fueron inyectadas, acompañando a los axones en crecimiento (Ramer et al., 2004).

En numerosos estudios *in vitro* se demostró que el co-cultivo de neuronas (principalmente células ganglionares de la retina) y glía envolvente, favorece el crecimiento axonal (Chung et al., 2004; Kafitz and Greer, 1999; Runyan and Phelps, 2009). Si bien se desconoce el mecanismo molecular por el cual esta glía promueve el crecimiento axonal, se determinó que es dependiente del Ca^{2+} intracelular (Hayat et al., 2003) y de BDNF (Pastrana et al., 2007; Runyan and Phelps, 2009). Por otra parte, en la mayoría de los estudios realizados *in vivo* en roedores se observó que esta glía favorece el crecimiento axonal en los sitios de injuria (Bartolomei and Greer, 2000; Gudiño-Cabrera et al., 2000; Ramer et al., 2004) e inclusive, en estudios conductuales se

demostró la recuperación funcional (Li et al., 1997; Ramón-Cueto et al., 2000). Sin embargo, algunos trabajos no pudieron reproducir estos resultados (Collazos-Castro et al., 2005; Lu et al., 2006).

Los ensayos clínicos para evaluar la seguridad y efectividad de los trasplantes de glía envolvente comenzaron en el año 2003. A la fecha, se han reportado 32 casos de trasplantes autólogos de células de la glía envolvente en pacientes con daño a la médula espinal. Los resultados sugieren que los trasplantes fueron bien tolerados, aunque el 15% de los pacientes desarrolló complicaciones causadas por el procedimiento, como mielomalacia (ablandamiento de la médula espinal producido por hemorragia) y siringomielia (desarrollo de una cavidad llena de líquido) (Ekberg and St John, 2014). Si bien algunos estudios reportaron cierta mejoría tras el tratamiento, otros sugirieron que el trasplante de esta glía no es una terapia eficiente para la reparación de las lesiones en la médula espinal (Feron et al., 2005; Lima et al., 2010; Mackay-Sim and St John, 2011; Mackay-Sim et al., 2008).

Las discrepancias en cuanto a la capacidad de la glía envolvente de promover el crecimiento de los axones dañados, así como la factibilidad de su aplicación clínica, pueden ser atribuidas principalmente a la variedad de protocolos utilizados para el aislamiento y el cultivo de esta glía, y a la plasticidad fenotípica que la misma manifiesta *in vitro* e *in vivo* (Raisman and Li, 2007). El escaso conocimiento acerca de los mecanismos subyacentes a los efectos regenerativos de la glía envolvente, dificulta el desarrollo de terapias regenerativas efectivas basadas en esta glía. Por lo tanto, resulta fundamental desarrollar nuevos modelos animales que permitan identificar mecanismos subyacentes a sus potenciales propiedades neurotróficas *in vivo* y que orienten el diseño de terapias de trasplante aplicables en la clínica.

3. La conectividad entre las células gliales y la modulación de la función neuronal

La señalización bidireccional entre neuronas y glía es fundamental para las funciones neuronales de conducción axonal, transmisión sináptica, maduración y plasticidad.

Una característica fundamental de la glía es la capacidad de formar redes de células conectadas por *gap junctions* (uniones comunicantes), que permiten el intercambio rápido de iones, metabolitos y sustancias neuro-activas. Estas redes gliales son selectivas y plásticas y se observó que pueden regular las sinapsis, los circuitos neuronales y el comportamiento.

En estudios desarrollados por nuestro grupo, se identificó que las células de la glía envolvente también pueden formar redes comunicadas por *gap junctions*, lo cual altera sus propiedades biofísicas de una manera selectiva. Sin embargo, se desconoce si la conectividad de esta glía afecta la funcionalidad de las neuronas sensoriales olfatorias y su capacidad de generarse de *ново* y establecer sinapsis.

3.1 Redes gliales y función neuronal

Tradicionalmente se consideraba que el procesamiento de la información en el cerebro era una función confinada a las neuronas. Sin embargo, los avances en la caracterización fisiológica y molecular de las células gliales, principalmente de los astrocitos, permitieron identificar la participación activa de estas células en la neurotransmisión. Los astrocitos pueden detectar señales neuronales mediante canales iónicos, receptores para neurotransmisores o transportadores, y responder vía señalización por Ca^{2+} , mediante plasticidad morfológica, y mediante la captación y liberación de factores neuro-activos que modulan la pre- y la post-sinapsis (Pannasch and Rouach, 2013). Por ejemplo, pueden modular la eficacia sináptica controlando la homeostasis de factores esenciales del metabolismo energético (Allaman et al., 2011), del K^+ extracelular (Wallraff et al., 2006) y del glutamato (Oliet et al., 2001).

Los astrocitos forman una extensa red de células conectadas por *gap junctions*, constituidas por el acoplamiento de hexámeros de proteínas integrales de membrana, denominadas conexas (Cx) (Goodenough et al., 1996). Existen 20 genes para conexas en el ratón y típicamente un tipo celular expresa más de un tipo de conexina (Theis et al., 2005). Las conexas también pueden funcionar como hemicanales, permitiendo el intercambio de moléculas entre el citoplasma y el medio extracelular (Bennett et al., 2003; Orellana et al., 2009). Además estas proteínas se asociaron con otras funciones como la de moléculas de adhesión (Elias et al., 2007) y la interacción con otras proteínas, tales como receptores, proteínas del citoesqueleto, kinasas y fosfatasas, vía su dominio carboxi-terminal (Kardami et al., 2007).

Las principales conexas que median las redes de astrocitos son la Cx30 y la Cx43 (Wallraff et al., 2006). Al igual que los circuitos neuronales, las redes astrogliales están organizadas en compartimentos anatómicos y funcionales, como se puede observar en estructuras altamente compartimentalizadas como la corteza somatosensorial y el bulbo olfatorio (Houades et al., 2008; Roux et al., 2011).

Se considera que una de las funciones principales de los astrocitos consiste en sustentar metabólicamente a las neuronas. *In vivo*, los astrocitos asimilan la mayor parte de la glucosa

durante la actividad neuronal (Chuquet et al., 2010). El lactato producido por los astrocitos en la metabolización de la glucosa, se propone que es la fuente de energía principal usada por las neuronas (Allaman et al., 2011; Suzuki et al., 2011). Se demostró que la privación de glucosa extracelular, induce la depresión de la transmisión sináptica en el hipocampo, pero ésta se recupera por el suministro de glucosa o lactato vía las redes astrocíticas, a condición de que la conectividad glial mediante *gap junctions* se encuentre funcional (Rouach et al., 2008).

Como se mencionó, una de las funciones de los astrocitos es el *clearance* del K^+ extracelular producido por la actividad neuronal. En ratones con astrocitos *knockout* para Cx30 y Cx43, se observó que aumenta la probabilidad de descargas epileptiformes (Wallraff et al., 2006) y se incrementa la fuerza sináptica excitatoria sobre las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Pannasch et al., 2011). Estos efectos se atribuyen a la remoción insuficiente de K^+ y de glutamato por los astrocitos desconectados (Pannasch et al., 2011).

La evidencia de la modulación de la función neuronal por las redes gliales trasciende a los astrocitos, ya que se observó que la deficiencia de Cx32 en las células de Schwann y los oligodendrocitos produce neuropatías asociadas a la pérdida de mielina (Sargiannidou et al., 2009).

3.2 Redes de glía envolvente

Las células de la glía envolvente olfatoria pueden formar redes de células conectadas por *gap junctions*. El acople por *gap junctions* en las células de la glía envolvente fue caracterizado por medio de experimentos de *dye-coupling* y registros electrofisiológicos (Rela et al., 2010).

En cuanto a la expresión de conexinas por la glía envolvente, se observó la colocalización de la inmunomarcación contra Cx43 y marcadores de esta glía (Figura I. 8).

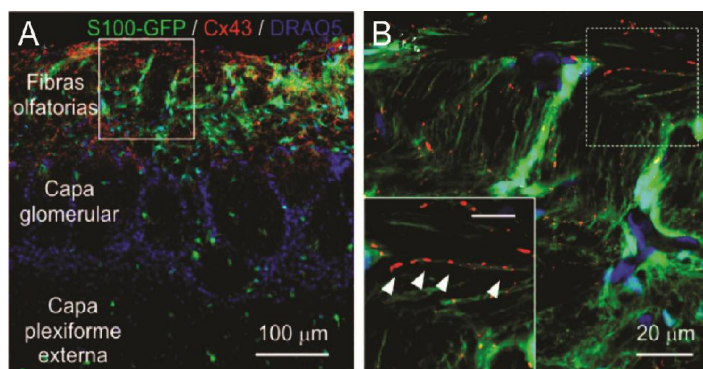


Figura I.8. Expresión de Cx43 en la glía envolvente. (A) Inmunomarcación contra Cx43 (rojo) en una sección de bulbo olfatorio de ratones genéticamente modificados que expresan GFP en la glía envolvente (S100-GFP en verde). (B) Aumento del cuadrante en (A). Los clusters de Cx43 colocalizan con las proyecciones de la glía envolvente (flechas). Adaptado de Rela et al., 2010.

Por el contrario, no se observó inmunorreactividad contra otras conexinas típicamente gliales (Cx26 y Cx32 y Cx30) (Rela et al., 2010; Roux et al., 2011), sugiriendo que la Cx43 es el candidato mediador del acople por *gap junctions* en la glía envolvente olfatoria.

Se reportó que la actividad de las neuronas sensoriales genera señales de Ca^{2+} en las células de la glía envolvente (Rieger et al., 2007). Dado que la capacidad promotora del crecimiento axonal de esta glía especializada es dependiente de Ca^{2+} intracelular *in vitro* (Hayat et al., 2003) y que el Ca^{2+} es un modulador de la conectividad mediada por *gap junctions*, resulta posible que las propiedades neurotróficas de la glía envolvente dependan de conexinas funcionales.

3.3 Regulación de las redes gliales en contextos de daño e inflamación

La extensión de la red astrogial es determinada por la permeabilidad y la selectividad de los canales de *gap junctions*, los cuales están regulados por una variedad de factores endógenos, tales como endotelinas, canabinoides y neurotransmisores (Giaume et al., 2010). Particularmente interesante es la regulación de las redes astrogiales en contextos de daño e inflamación. Los astrocitos en cultivo presentan una reducción en la expresión de Cx43 y en el acople mediado por *gap junctions* en respuesta a citoquinas proinflamatorias como interleukina 1β y el factor de necrosis tumoral alfa, $\text{TNF-}\alpha$ (Hinkerohe et al., 2005). Inclusive, en un modelo de inflamación cerebral *in vivo*, se reportó que los astrocitos exhiben un gradiente en el grado de acople por *gap junctions* en función de la distancia al foco inflamatorio; el acople es reducido en la cercanía del foco inflamatorio y aumenta con la distancia a este, pero en contraste la funcionalidad de los hemicanales de conexina es mayor en la cercanía del foco inflamatorio (Karpuk et al., 2011). Si la reducción de la expresión de Cx43 en condiciones de inflamación resulta neurotóxica o si representa un efecto compensatorio neuroprotector, es motivo de debate (Chanson et al., 2005; Giaume et al., 2010). Recientemente se ha mostrado que la reducción de la expresión de Cx43 en astrocitos se asocia con una menor respuesta inflamatoria en un modelo de sepsis neonatal (Zhou et al., 2015) sugiriendo un rol compensatorio beneficioso de la reducción de Cx43 astrocítica en contextos de inflamación.

Por otra parte, se observó que en respuesta a una isquemia cerebral la expresión de Cx43 en los astrocitos aumenta (Nakase et al., 2006) y que la deficiencia de Cx43 en astrocitos reduce el volumen de la injuria y la apoptosis neuronal (Li et al., 2015). Por lo tanto, la respuesta glial en cuanto a la expresión de conexinas y su contribución a la recuperación luego de daño dependen del tipo de daño.

En esta tesis validamos un modelo para eliminar la expresión de Cx43 en la glía envolvente, para evaluar su impacto en la formación de redes y en las propiedades neurotróficas de la vía aferente olfatoria.

Hipótesis y Objetivos

La glía envolvente reúne condiciones anatómicas y funcionales que permiten postular que contribuye con la capacidad neurotrófica y regenerativa del nervio olfatorio, que sostiene la incorporación de neuronas sensoriales nuevas al circuito olfatorio. Estas incluyen su estrecha relación con los axones de las neuronas sensoriales, su capacidad de producir neurotrofinas y su capacidad de promover el crecimiento axonal *in vitro* y en modelos de daño a la médula espinal. Dado que la caracterización de las propiedades neurotróficas de la glía envolvente se realizó principalmente en cultivo, los mecanismos propuestos deben ser validados *in vivo*. El **objetivo general** de esta tesis es identificar mecanismos subyacentes a las propiedades neurotróficas de la glía envolvente en modelos murinos.

La expresión de conexinas y la conectividad mediada por *gap junctions* es necesaria para funciones de otros tipos gliales, tales como la modulación de la transmisión sináptica y el soporte a la migración neuronal. La glía envolvente expresa principalmente conexina 43 (Cx43) y forma redes mediadas por *gap junctions*. Dado que la capacidad de esta glía de promover el crecimiento axonal *in vitro* es dependiente de Ca^{2+} , y a su vez este modula la permeabilidad de conexinas, es posible que la Cx43 de la glía envolvente participe en la permisividad del nervio olfatorio para el crecimiento axonal y la integración de las neuronas nuevas. Nuestra **hipótesis** sostiene que la expresión de Cx43 por la glía envolvente media la conectividad por *gap junctions* de la glía envolvente y participa en el establecimiento de un entorno permisivo para la incorporación de neuronas nuevas al circuito olfatorio.

Objetivo 1: Evaluar si la expresión de Cx43 y marcadores biofísicos de la formación de redes se modulan en la glía envolvente durante la degeneración/regeneración luego de daño al nervio olfatorio.

Objetivo 2: Evaluar si la delección de Cx43 en la glía envolvente se asocia con parámetros electrofisiológicos indicativos de la desconexión glial.

Objetivo 3: Evaluar la necesidad de Cx43 para el mantenimiento y la funcionalidad del circuito olfatorio.

Materiales y Métodos

1. Animales

Para identificar a las células de la glía envolvente olfatoria, se utilizaron ratones genéticamente modificados que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo la secuencia regulatoria de la proteína S100B, marcador de subpoblaciones de glía que incluyen a la glía envolvente. Estos animales tienen un transgen que consta de 9.4 kb de la secuencia regulatoria del gen humano de S100B río arriba de la región codificante de GFP mejorada (*enhanced GFP*, EGFP) (Jackson B6.D2-Tg(S100B-EGFP)1Wjt/J; donado por Wesley Thompson) (Zuo et al., 2004). El contexto genético es C57BL/6 X DBA. Para identificar la presencia del transgen, los ratones se fenotipificaron mediante la observación de sus ojos bajo luz azul. Los ratones S100B-GFP+ presentan ojos fluorescentes a la luz azul debido a la expresión de la proteína S100B por células epiteliales del cristalino (Zhang et al., 2016) (Figura M.1).

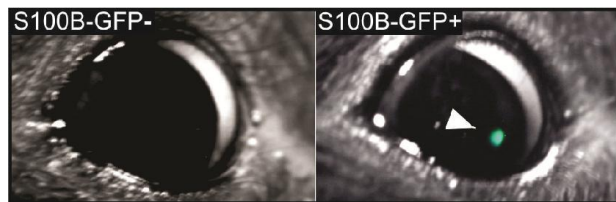


Figura M.1. Fenotipificación de la línea S100B-GFP. Observación bajo lupa del ojo de ratones de la línea S100B-GFP expuestos a luz azul. La flecha indica la fluorescencia evocada en un ratón GFP+. El panel de la izquierda corresponde a un ratón GFP-.

Las jaulas de cruce se armaron con ratones heterocigotas para el transgen S100B-GFP de un sexo y ratones sin el transgen del otro sexo. Esta estrategia permitió mantener la línea en heterocigosis, identificando a los animales por su fluorescencia.

Por otra parte, para inducir la delección selectiva de Cx43 en la glía envolvente olfatoria se usaron ratones genéticamente modificados que denominamos *knockout* condicional de Cx43 (cCx43KO). Estos animales se obtuvieron de la descendencia de dos líneas parentales obtenidas de Jackson Laboratories: **a)** La línea Cx43^{fllox/fllox} (Jackson B6.129S7-Gja1tm1Dlg/J) que posee el exón 2 del gen que codifica la Cx43 flanqueado por secuencias *loxP* (Liao et al., 2001) y **b)** La línea PLP-CreER^T (Jackson B6.Cg-Tg(Plp1-cre/ESR1)3Pop/J) que expresa una proteína de fusión entre la enzima recombinasa Cre y el dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno humano, mutado, tal que puede unirse al ligando sintético tamoxifeno, pero no al ligando endógeno estradiol (Doerflinger et al., 2003). La expresión de la recombinasa Cre está dirigida por la secuencia regulatoria del gen de PLP que se expresa en la glía envolvente. La proteína CreER^T es citoplasmática, donde es funcionalmente inactiva, pero transloca al núcleo en presencia de tamoxifeno (Figura M.2), donde cataliza la recombinación de los sitios *loxP* y produce la delección del exón 2 de la Cx43. Por lo tanto, se espera que en los ratones portadores de la doble modificación genética ocurra la delección de la Cx43 en la glía envolvente ante la administración de tamoxifeno. Los animales experimentales se obtuvieron en la segunda generación (F2) de la cruce

entre las líneas parentales citadas anteriormente y se generaron a partir del cruzamiento de ratones de la primera generación (F1 x F1), de genotipos $Cx43^{flox/+}$ X $Cx43^{flox/+};PLP-CreER^T$ (Figura M.3).

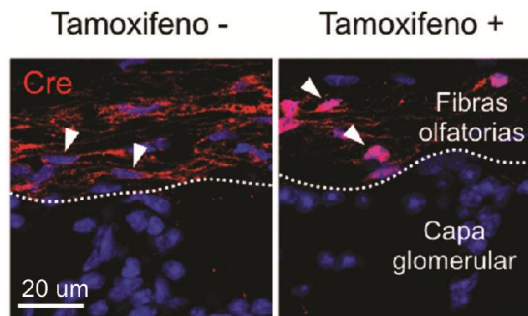


Figura M.2. Translocación al núcleo de la recombinasa Cre por la administración de tamoxifeno. Inmunohistoquímica dirigida a la recombinasa Cre en secciones de bulbo olfatorio de ratones $Cx43^{flox/flox};PLP-CreER^T$ tratados con tamoxifeno. El tamoxifeno induce la translocación de la recombinasa Cre del citoplasma al núcleo (indicado con flechas) en la glía envolvente.

Las jaulas de cruce se armaron con un macho y dos hembras mayores a 80 días de edad postnatal. Para los experimentos se utilizaron tanto machos como hembras adultos, de 60 días de edad. Una semana antes de todos los tratamientos, los animales experimentales se separaron en jaulas con un máximo de 4 animales por jaula de acuerdo al tratamiento asignado.

Los animales se mantuvieron en un ambiente de humedad y temperatura controladas, con ciclos de 12:12 horas de ciclo luz: oscuridad (la luz fue encendida a las 7 am) y se alimentaron *ad libitum*. Su manejo se realizó bajo las normas y protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

2. Genotipificación

La identificación de los genotipos de la línea generada $cCx43KO$ se realizó mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN se obtuvo por hidrólisis alcalina de una biopsia de la cola de cada animal. Para identificar la presencia del transgen de $Cx43$ se utilizaron los *primers* 5'-CTTTGACTCTGATTACAGAGCTTAA-3' y 5'-GTCTCACTGTTACTTAACAGCTTGA-3', recomendados por Jackson Laboratories, en una concentración 0.83 μM en la mezcla de reacción. Por otra parte, la presencia del transgen $PLP-CreER^T$ se detectó utilizando los *primers* 5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3' y 5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3', que amplifican la secuencia de Cre, y un par de *primers* control que amplifican la secuencia de interleukina 2 (5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3' y 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3') también recomendados por Jackson Laboratories, en una concentración de 1 mM y 0.5 mM, respectivamente. La amplificación de IL-2 se espera en todos los casos y permite evaluar la calidad de la muestra, reduciendo la probabilidad de falsos

negativos en la amplificación de Cre. Los ensayos de PCR se realizaron con agua de calidad molecular (Sigma), y Buffer, DNTPs y GoTaq Polimerasa (Promega). Se utilizó una termocicladora PTC-100 (MJ Research). La amplificación de ADN para identificar los transgenes se realizó mediante PCR convencional de 35 ciclos. Cada ciclo incluyó un paso de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, un paso de hibridación (*annealing*) por 30 segundos a 55°C para el transgen de Cx43 y por 1 minuto a 58.7°C para el transgen PLP-CreER^T, y un paso de extensión a 72°C por 30 segundos ó 1 minuto, respectivamente. Con los productos de la PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa 2% con 0,5 mg/ml de Bromuro de Etidio (BrEt, Sigma-Aldrich) y se visualizó el producto bajo luz ultravioleta. Junto con las muestras incógnita se corrieron muestras controles de genotipo conocido.

3. Tratamientos administrados a los animales

3.1 Modelo de daño reversible al epitelio olfatorio: tratamiento con metimazol

El modelo de daño reversible al epitelio olfatorio inducido por metimazol ha sido extensamente usado en la literatura (ver introducción, sección 1.3). Se utilizaron ratones de fenotipo GFP+ de la línea S100B-GFP. Una semana antes de iniciar el tratamiento, las hembras fueron alojadas a razón de 4 animales por jaula como máximo. En el caso de los machos, debido a que el tratamiento con metimazol produjo una tasa elevada de agresión, que especulamos se asocia a la disminución de la capacidad olfativa (Blanco-Hernández et al., 2012; Genter et al., 1995; Xu and Slotnick, 1999), fue necesario idear jaulas con un separador de acrílico para alojar animales individualmente. Este diseño permitió que los animales, uno de cada lado del acrílico, compartan viruta y similares estímulos olfativos, pero queden aislados físicamente, evitando que los machos se agredan.

Los ratones experimentales se inyectaron por vía intraperitoneal con 50 mg/kg de metimazol (Sigma-Aldrich) en solución salina estéril, en el día 1 y el día 4 del experimento y los animales de los grupos control recibieron vehículo (Bergman et al., 2002; Booker-Dwyer et al., 2008). Estos dos grupos, se separaron a su vez en dos grupos, que se evaluaron a los 5 y 15 días posteriores a la primera dosis con metimazol/salina, respectivamente.

3.2 Knockout condicional de Cx43 en la glía envolvente: tratamiento con tamoxifeno

Los animales experimentales se generaron como se indicó en la sección 1. Se utilizaron los siguientes genotipos: 1) animales con la doble modificación genética Cx43^{flox/flox};PLP-CreER^T

tratados con tamoxifeno (cCx43KO) (se espera la inducción del *knockout* de Cx43 en la glía envolvente) 2) los genotipos controles portadores de una única modificación genética a) Cx43^{flox/flox} y b) PLP-CreER^T (en ambos se espera que el tamoxifeno no induzca la delección de Cx43), y 3) un control adicional que corresponde al doble transgénico Cx43^{flox/flox};PLP-CreER^T que en lugar de tamoxifeno se trató con vehículo (Figura M.3).

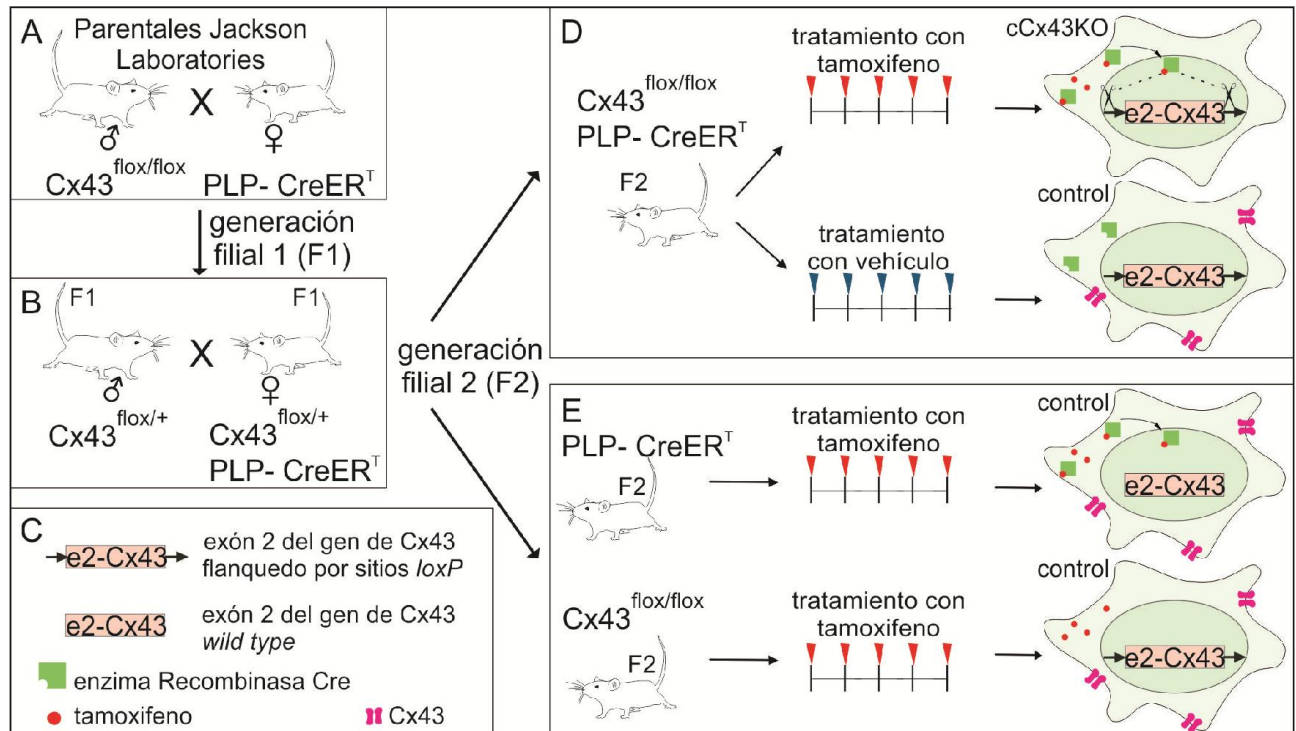


Figura M.3. Knockout condicional de Cx43 en la glía envolvente. Esquema de cruzamientos y tratamiento; sólo se incluyen los genotipos de interés de cada generación filial. **(A)** Líneas parentales de Jackson Laboratories. **(B)** Cruzamiento de ratones de la F1 de A. **(C)** Referencias. **(D)** Ratón portador de la doble modificación genética que pertenece a la F2 de B. Arriba, tras el tratamiento con tamoxifeno, se espera que la enzima recombinasa Cre unida a su ligando tamoxifeno, se transloque al núcleo y se deleccione el exón 2 del gen de Cx43 que está flanqueado por sitios *loxP* y que la glía envolvente no exprese Cx43. Abajo, tras la administración de vehículo, se espera que la enzima recombinasa Cre no se pueda translocar al núcleo y la glía envolvente continúe expresando Cx43. **(E)** Arriba, ratón portador del transgen PLP-CreER^T que pertenece a la F2 de B. Tras el tratamiento con tamoxifeno, se espera que la enzima recombinasa Cre transloque al núcleo pero, al no estar presentes los sitios *loxP* en el exón 2 de la Cx43, no haya recombinación y la glía envolvente continúe expresando Cx43. Abajo, ratón portador del transgen Cx43^{flox/flox} que pertenece a la F2 de B. Tras el tratamiento con tamoxifeno, se espera que, si bien el exón 2 del gen de Cx43 está flanqueado por sitios *loxP*, al no haber enzima recombinasa Cre, no haya recombinación y la glía envolvente continúe expresando Cx43.

La delección de Cx43 se realizó mediante la administración intraperitoneal por 5 días consecutivos de una dosis diaria de 100 mg/kg de tamoxifeno (Sigma-Aldrich) disuelto en vehículo: una mezcla 1:10 de etanol y aceite de girasol (Sigma-Aldrich). La dosis de tamoxifeno se eligió por adaptación del protocolo de Doerflinger et al., 2003.

3.3 **Ensayo de pulso y caza de cohortes de células nuevas: tratamiento con BrdU**

Se utilizaron ratones genéticamente modificados de la línea generada de *knockout* condicional de Cx43, que se trataron como se indicó en la sección 3.2. Luego de 45 días desde la primera dosis de tamoxifeno, los animales recibieron 3 dosis de 5 - Bromo - 2'deoxyUridina (BrdU) (Sigma-Aldrich) de 50 mg/kg en salina estéril por vía intraperitoneal, espaciadas cada 5 horas. El BrdU marca las células que se encuentran en división al momento de la administración del compuesto y a su progenie. Para estudiar la tasa de maduración de las neuronas nuevas del epitelio olfatorio, se evaluó mediante inmunofluorescencia la colocalización de BrdU con marcadores de maduración de neuronas sensoriales a dos tiempos luego del pulso: un grupo de animales se procesó a los 7 días post-administración de BrdU y otro grupo se procesó a los 11 días después del tratamiento. El protocolo experimental se diseñó a partir de la adaptación de los protocolos de Hinds et al., 1984; Jia et al., 2009; y Matarazzo et al., 2004.

4. **Ensayos conductuales**

Los experimentos conductuales de esta tesis se realizaron con la guía del Dr. Juan Belforte.

4.1 **Ensayo olfativo de habituación-deshabituación**

Se evaluó la actividad exploratoria olfativa de los animales ante olores artificiales y olores sociales mediante una tarea olfativa de habituación-deshabituación. Los animales se sometieron a la tarea conductual a los 15, 30, 45 y 60 días después del tratamiento con tamoxifeno. El dispositivo experimental consistió en una jaula idéntica a las de alojamiento regular de los animales (30 x 20 x 14 cm) con una tapa de acrílico de (40 x 30 cm) con un orificio central, por donde se presentó una serie de estímulos olfativos. Cada estímulo consistió en un hisopo de algodón embebido en una solución acuosa de odorante para los olores artificiales o del raspado de una jaula para los olores sociales (Figura M.4). La base de la jaula se cubrió con una capa delgada de viruta para poder observar con facilidad el movimiento del animal. Los ratones se habituaron al cuarto conductual por al menos 1 hora y a la jaula de testeo por 10 minutos. Se presentaron 5 estímulos diferentes y cada uno se presentó 3 veces consecutivas durante 2 minutos, con un intervalo entre estímulos mínimo asociado al reemplazo de un hisopo por el siguiente. Entre presentaciones, la tapa de la jaula se removió permitiendo que se renueve su atmósfera. La posición del hisopo dentro de la jaula fue equivalente en todas las presentaciones. La secuencia de presentación de estímulos olfativos fue la siguiente: agua; olor artificial I: esencia artificial comestible de vainilla (Fleibor) 1:50 en agua milli-Q; olor artificial II: esencia artificial

comestible de coco (Fleibor) 1:200 en agua milli-Q; olor social I: hisopado de una jaula demostradora del mismo sexo (machos); olor social II: hisopado de una jaula demostradora del sexo opuesto (hembras). Para presentar los estímulos olfativos de los olores artificiales, los hisopos se sumergieron por 1 minuto en la solución con el estímulo y luego se presionaron sobre un filtro para evitar derrames en la jaula de testeo. Para presentar los estímulos de los olores sociales, las jaulas de ratones demostradores se hisoparon raspando los hisopos contra las 4 esquinas de la jaula. Se utilizaron 2 jaulas de animales demostradores, una de ratones macho y otra de ratones hembra, con 4 animales por jaula y 6 días sin higienizar. El protocolo experimental se adaptó de Belforte et al., 2010; Luo et al., 2002; y Pan et al., 2012.

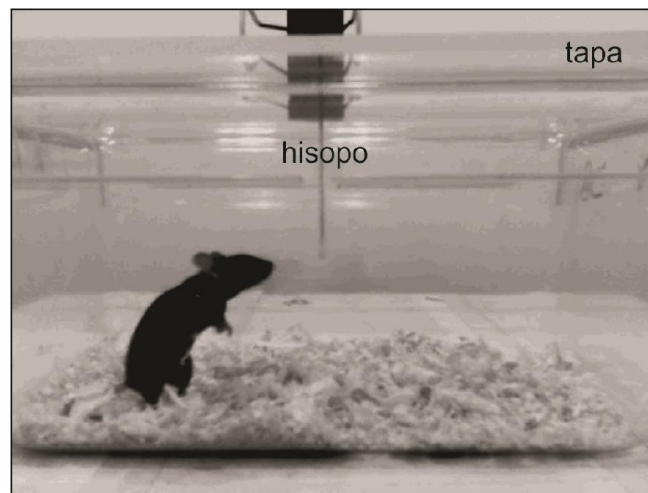


Figura M.4. Ensayo conductual olfativo de habituación/deshabituación. Jaula de testeo.

Al finalizar el testeo de cada ratón, la jaula se limpió con etanol 70% (v/v) y la viruta se reemplazó por nueva. La actividad de los ratones se registró con una cámara montada lateralmente frente a la dimensión mayor de la jaula de testeo. Los videos se analizaron a posteriori y con un cronómetro se cuantificó manualmente el tiempo que cada ratón olfateó voluntariamente el hisopo (**tiempo de *sniffing***). Se consideró que el ratón estaba realizando la conducta de *sniffing*, siempre que efectuó movimientos de inhalación voluntarios con las narinas en dirección al hisopo. La cuantificación de los videos se realizó de manera ciega al tratamiento.

Para validar el ensayo de habituación/deshabituación bajo nuestras condiciones experimentales, un grupo de animales de los genotipos portadores de una única modificación genética, recibió vehículo en lugar de tamoxifeno y 30 días después se sometieron al ensayo de habituación/deshabituación para evaluar el nivel basal de actividad olfativa. Posteriormente, la mitad de estos animales recibió el tratamiento con metimazol y la otra mitad recibió salina (ver detalle en la sección 3.1). A los 5 días de la primera dosis de metimazol/salina, los animales se testearon en el ensayo de habituación/deshabituación (tiempo en el que se espera observar una

reducción de la capacidad olfativa debida al metimazol). El ensayo se repitió a los 30 días de la primera dosis de metimazol/salina (tiempo en el que se espera observar la recuperación de la capacidad olfativa debido a la recuperación del epitelio olfatorio).

4.2 Estimulación olfativa para inducir la activación de c-fos en el bulbo olfatorio

15 días después del último testeo conductual en el ensayo de habituación/deshabituación los ratones se sometieron a una estimulación olfativa reportada como efectiva para inducir la activación de c-fos en las interneuronas periglomerulares del bulbo olfatorio.

Se presentó el estímulo coco durante 2 minutos y se retiró por un intervalo de 3 minutos, a fin de minimizar la adaptación (período de aire sin estímulo); esta secuencia se repitió 6 veces, hasta cumplir un total de 30 minutos. A continuación los ratones se colocaron en una jaula sin presentación de estímulos por 1 hora hasta su sacrificio. El protocolo de inducción de c-fos fue adaptado de Bautze et al., 2012. Los niveles de proteína c-fos se midieron por inmunofluorescencia.

4.3 Ensayo de exploración de una arena abierta (*open field*)

Se estudió la actividad locomotora horizontal durante 15 minutos en una arena abierta, constituida por un campo de 40 x 40 cm, colocada en el centro de una habitación (2 x 1.8 m) con iluminancia homogénea de 100 lux, una semana después del test de habituación/deshabituación, a fin de minimizar la interferencia entre los ensayos conductuales.

La actividad de los ratones fue registrada por una cámara cenital, y su posición en función del tiempo fue determinada por el programa de rastreo automático ANY-maze (Stoelting Co.), que permite definir áreas virtuales: un área periférica adyacente a las paredes que delimitan la arena y un área central. El programa arroja mediciones de distancia total recorrida, máxima velocidad, distancia recorrida en el centro, y tiempo en el centro.

5. Electrofisiología

5.1 Obtención de rodajas agudas de bulbo olfatorio para registros electrofisiológicos

Se prepararon rodajas agudas de bulbo olfatorio según lo reportado en Rela et al., 2010. Los ratones se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg) por vía intraperitoneal y luego se decapitaron. Rápidamente se retiró el cerebro y se lo colocó en solución de corte fría (0-4°C) y carbogenada (95% O₂ / 5% CO₂) de contenido (en mM): sacarosa 220, KCl 2.5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 6, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26 y glucosa 10. El cerebro se adhirió con pegamento de cianocrilato a la platina de un vibrátomo (Pelco T series 1000, Ted Pella) conteniendo la misma solución. Se cortaron rodajas de 300 μ m de espesor y se mantuvieron por al menos 1 hora en una cámara conteniendo solución de registro (líquido cefalorraquídeo artificial carbogenado, ACSF) y a temperatura ambiente, de contenido (en mM): NaCl 125, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1.1, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26 y glucosa 10; pH 7.4.

5.2 Registros electrofisiológicos

Las rodajas se transfirieron a una cámara de registro (Warner Instruments) perfundida con ACSF con un flujo de 3 ml/min mediante una bomba peristáltica (Ismatec, Alemania). La identificación de las células registradas se realizó con un microscopio (Nikon Eclipse) equipado con un objetivo de inmersión 60x, óptica para contraste por interferencia diferencial (DIC) y fluorescencia, y una cámara infrarroja conectada a un monitor y a la computadora. La glía envolvente fue identificada en la capa de las fibras olfatorias del bulbo, dónde constituye la mayoría de las células (Au et al., 2002; Valverde and Lopez-Mascaraque, 1991). En los registros de los animales de la línea S100B-GFP, las células se identificaron por su fluorescencia verde. Se evitaron las células anexas a los vasos.

Los registros se realizaron en configuración *whole cell* en el modo *voltage-clamp*. Se utilizaron pipetas de borosilicato (1.50/1.10 mm de diámetro externo/interno, respectivamente; BF150-110-10; Sutter Instrument, Novato, CA) fabricadas con un *puller* (P-97, Sutter Instruments). La resistencia de las pipetas fue de 5-10 M Ω cuando se cargaron con solución intracelular de contenido (en mM): KCl 130, CaCl₂ 0.25, MgCl₂ 4, EGTA 5, HEPES 10, K₂ATP 4, Na₂GTP 0.5 y fosfocreatina 10. El pH de 7.3 de la solución intracelular se ajustó con KOH y la osmolaridad se midió con un osmómetro de presión de vapor (VAPRO 5520, Wesco, Logan, UT); la osmolaridad de la solución intracelular y la extracelular de registro (ACSF) fue de 295-300 y 305-310 mOsm, respectivamente. A la solución de la pipeta se agregó 0.1% de Lucifer Yellow (LY, sal de litio, Invitrogen/Molecular Probes) para confirmar la identidad mediante la visualización de la morfología

de la glía envolvente registrada. Los registros se realizaron usando un amplificador Axoparch-1D (Molecular Devices). La señal de corriente fue filtrada con un filtro pasa-bajo de 1 kHz y digitalizada a una frecuencia de muestreo de 10 kHz usando una interfase Digidata 1322A (Molecular Devices); la adquisición se realizó con una computadora equipada con el software pClamp 9.2 (Molecular Devices). Se compensaron la capacitancia y la resistencia en serie (al menos 60%) para minimizar los errores de voltaje. Estos parámetros se determinaron mediante la compensación de un pulso hiperpolarizante de 10 mV y 50 ms. No se substrajo la conductancia de fuga (*leak conductance*). El potencial de reposo (V_r) se determinó a partir de una rampa de pulsos de voltaje (-160 a -120 mV, en 80 ms) como el voltaje correspondiente al valor cero de corriente. El potencial de mantenimiento (*holding potential*) se definió en -80 mV, cercano al reposo. Para evaluar el perfil electrofisiológico, se aplicó una serie de pulsos de voltaje de 400 ms de duración, desde -160 mV hasta +120 mV, con incrementos de 20 mV.

El **ácido meclofenámico (MFA)**, un bloqueante no selectivo de uniones comunicantes (*gap junctions*) se diluyó en ACSF a una concentración 100 μ M a partir de una solución *stock* 25 mM en agua y se aplicó mediante el sistema de perfusión. Se registró cada 5 minutos y se consideró para el análisis el punto de 20-25 minutos después del inicio de la perfusión con MFA.

5.3 Análisis de registros electrofisiológicos

Todos los registros se analizaron utilizando el *software* ClampFit (Molecular Devices).

Determinación de la resistencia de acceso (R_a): La R_a es una medida de la calidad de los registros y representa la resistencia al paso de corriente desde la pipeta hacia el interior celular. Se calculó a partir del pico transitorio capacitivo en la corriente evocada por un pulso de voltaje hiperpolarizante de 10 mV y 50 ms, promediando 5 repeticiones y en ausencia de compensación, según la ley de Ohm $V/I=R_a$ (Figura M.5). Cuanto mayor es la R_a , más deficiente es el acceso a la célula.

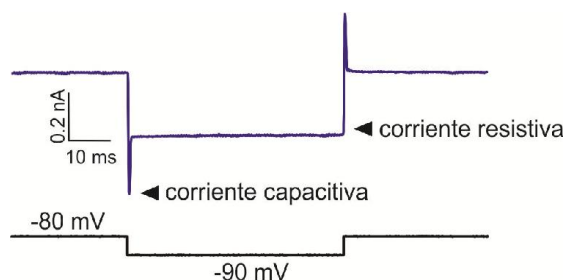


Figura M.5. Amplitud de la corriente capacitiva de una célula de la glía envolvente. Registro de la amplitud de corriente evocada por un pulso de voltaje hiperpolarizante de 10 mV. Se distingue entre la corriente capacitiva transitoria y la corriente resistiva.

Determinación de la resistencia de entrada, *input resistance* (R_i): se midió la amplitud de la corriente evocada por un pulso hiperpolarizante (-20 mV y 400 ms) en el estado estacionario y se calculó a partir de la ley de Ohm ($V/I= R_i$).

Construcción de la curva I/V: las amplitudes de corriente evocadas por una serie de pulsos de voltaje (-160 a +120 mV cada 20 mV, de 400 ms de duración) se midieron en el estado estacionario y se graficaron en función del voltaje.

Corriente sensible al MFA: se calculó como la resta trazo por trazo de la corriente registrada en condición control, menos la corriente registrada en presencia de MFA, usando el software Clampfit (Molecular Devices).

Criterios de exclusión de registros: se excluyeron del análisis los registros con una $R_a > 25 \text{ M}\Omega$, aquellos en los que el valor de la R_a varió más del 20% durante el registro (para garantizar que la potencial reducción de corriente observada durante la incubación con MFA no se deba a variaciones en el acceso a la célula) y los registros de células con $V_r > -55 \text{ mV}$.

6. Ensayo de captura de bromuro de etidio

El ensayo de captura de BrEt se adaptó de Roux et al., 2015. Se utilizaron rodajas agudas de bulbo olfatorio de 300 μm de espesor que fueron preparadas como se describió para la realización de los registros electrofisiológicos (sección 5.1). Luego de su recuperación, se incubaron durante 25 minutos con ACSF o ACSF+ MFA (100 μM); todas las soluciones se carbogenaron. A continuación se incubaron en la misma solución con agregado de BrEt 4 μM . Luego se lavaron dos veces por 5 minutos con ACSF ó ACSF+MFA, según correspondiera, y se fijaron por incubación en paraformaldehído (PFA) 4% en *buffer* fosfato salino 0.1 M de pH 7.4 (PBS) por 3 horas, a 4 °C con agitación. Después se montaron y micrografieron mediante microscopía confocal.

7. Fijación por perfusión intracardiaca

Los animales se anestesiaron por administración intraperitoneal de hidrato de cloral (400 mg/kg) y se perfundieron por canulación aórtica con 10 ml de PBS frío con heparina sódica 10 UI/ml (Laboratorios Duncan). Luego se perfundieron con 80 ml de solución fijadora fría conteniendo PFA al 4% en PBS. Los cerebros y las narices se disecaron y post-fijaron en la misma solución durante 2 horas a 4°C, y posteriormente se transfirieron a PBS por 8 horas a 4°C. Para su criopreservación los cerebros se incubaron en PBS con sacarosa 30% a 4°C por 24 horas, luego se incluyeron en medio Cryoplast (Biopack, Argentina), se congelaron y se conservaron a -20°C. Por otro lado, las narices luego de fijadas y transferidas a PBS se descalcificaron mediante transferencia a una solución saturada con el quelante de calcio EDTA 12% en agua por 7 días a 4°C. Posteriormente se pasaron a PBS a 4°C por 8 horas y se criopreservaron del mismo modo que los cerebros.

8. Inmunofluorescencia

En crióstato se cortaron secciones coronales de 30 µm de espesor para el bulbo olfatorio y de 40 µm de espesor para las narices. Las secciones de bulbo olfatorio se montaron en portaobjetos gelatinizados con una solución de gelatina para histología (Sigma-Aldrich) 1% y 0.05% de sulfato de cromo y potasio [KCr(SO₄)₂] en agua. Se seleccionaron para inmunofluorescencia las secciones correspondientes a los 2 mm intermedios del bulbo olfatorio en el eje anteroposterior. Por otra parte, las secciones de epitelio olfatorio se montaron en portaobjetos positivados (GENEX, Argentina). Se colectaron secciones coronales de anterior a posterior, desde la aparición del ectoturbinal 2 (Levai et al., 2003) hasta finalizar el epitelio. Las secciones montadas se conservaron a -20°C.

Los cortes se secaron en una plancha térmica a 60°C por 15 minutos. Luego se definió con silicona un pocillo (*well*) de incubación alrededor de cada sección, con capacidad para 45 µl de solución. Los cortes se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y se bloquearon los sitios de pegado inespecífico incubando por 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de bloqueo conteniendo: seroalbúmina bovina 2% y triton-X100 0.3% (v/v) en PBS. Luego los cortes se incubaron por 8 horas a 4°C con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo. Se lavó 3 veces por 5 minutos con PBS conteniendo 0.3% de triton-X100 y luego se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios y DAPI (Sigma-Aldrich) 1 µg/ml para marcación de núcleos, en solución de bloqueo. Se lavó 3 veces por 5 minutos con PBS conteniendo 0.3% de triton-X100 y se cubrieron con cubreobjetos y medio de montaje Fluoro-Gel (Electron Microscopy Sciences). Para las secciones de bulbo olfatorio, se agregó un paso de incubación con sudan-black 1% en metanol por 5 minutos a temperatura ambiente (Schnell et al., 1999), para reducir la autofluorescencia de gránulos de lipofusina presentes en la capa de fibras olfatorias y en la capa glomerular del bulbo olfatorio (Kosaka et al., 2009; Oliveira et al., 2010). Se lavó con etanol 70% y luego con PBS 3 veces por 5 minutos. En todos los casos se verificó que la fluorescencia dependiera de la inmunomarcación específica mediante la inclusión en paralelo de un control omitiendo los anticuerpos primarios.

Para la detección de BrdU, se aplicó un tratamiento de exposición de epítopes (*retrieval*). Los cortes, luego de secados y lavados con PBS, se incubaron en buffer citrato (ácido cítrico 0.1M y citrato de sodio 0.1M), pH 6 a 75°C por 5 minutos y luego a 1°C durante 5 minutos; este procedimiento se repitió 3 veces. Luego se lavó con PBS 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con HCl 0.025 N durante 30 minutos a 65 °C, se neutralizó con *buffer* borato 0.1 M pH 8.6 por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos. Finalmente, se prosiguió con la inmunohistoquímica de acuerdo a lo descripto previamente.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus especificaciones se detallan en la siguiente tabla:

Tabla de anticuerpos usados en los ensayos de inmunofluorescencia		
Marcación	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Conexina 43 (Cx43)	Mouse anti-Cx43 IgG ₁ (Millipore MAB3068), 1:500	Goat anti-mouse IgG ₁ Alexa Fluor 555 (Invitrogen 21127), 1:1000
Conexina 30 (Cx30)	Rabbit anti-Cx30 (Invitrogen 712200), 1:1000	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034), 1:1000 Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen A21428), 1:1000
c-fos	Rabbit anti-c-fos (4) (Santa Cruz Sc-52), 1:800	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034), 1:1000
Tirosina hidroxilasa (TH)	Rabbit anti-TH (Millipore AB152), 1:1000	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034), 1:1000
Lucifer Yellow (LY)	Rabbit anti-lucifer yellow (Invitrogen A-5750), 1:1000	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen A21428), 1:1000
Growth associated protein 43 (GAP-43)	Rabbit anti-GAP-43 (Novus Biologicals NB300-143), 1:1000	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034), 1:1000 Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen A31572), 1:1000
Olfactory marker protein (OMP)	Goat anti-OMP (Wako Chemicals, 544-10001) 1:200	Donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11055), 1:1000
Bromodeoxyuridine (BrdU)	Rat anti-BrdU (Abcam, ab6326), 1:600	Goat anti-Rat IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A-1006) 1:1000
Brain lipid binding protein (BLBP)	Rabbit anti-BLBP (Millipore ABN14), 1:700	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034), 1:1000

Las imágenes de inmunofluorescencia se adquirieron con un microscopio confocal Olympus FV1000/IX81, utilizando un objetivo de inmersión en aceite (40X, apertura numérica 1,3), como secciones ópticas únicas (con excepción de la inmunofluorescencia contra TH, que se adquirió un *stack* de 3 secciones de 2 μm cada una) a aproximadamente 10 μm desde la superficie del tejido y en la zona medial del bulbo olfatorio. Las fotos que se incluyeron en un mismo análisis se tomaron con los mismos parámetros de detección. Todas las imágenes se adquirieron a ciegas del tratamiento.

9. Análisis de imágenes

El análisis de las imágenes se realizó con el *software* ImageJ (Schneider et al., 2012). En todos los casos la cuantificación de las imágenes se realizó a ciegas del tratamiento.

9.1 Análisis de la inmunoreactividad contra conexinas

Capa glomerular. Para cuantificar la inmunomarcación contra conexinas en la capa glomerular, se seleccionaron 3 glomérulos al azar por foto y se analizó la intensidad promedio de la marca de conexina por unidad de área (Figura M.6)

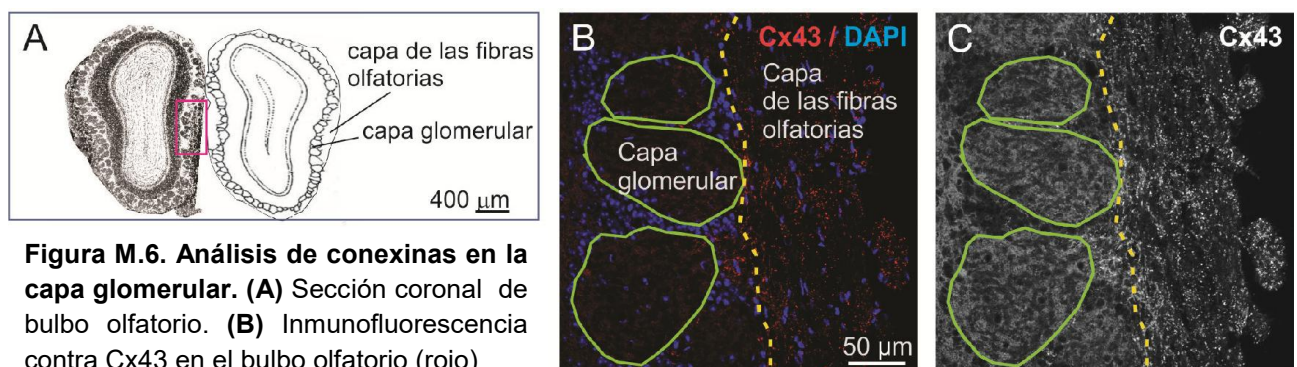


Figura M.6. Análisis de conexinas en la capa glomerular. (A) Sección coronal de bulbo olfatorio. (B) Inmunofluorescencia contra Cx43 en el bulbo olfatorio (rojo) y marcación nuclear (azul, DAPI). La línea punteada separa la capa glomerular de la capa de fibras olfatorias. En verde se marcan 3 regiones (glomérulos) representativas. (C) Canal rojo (Cx43).

y marcación nuclear (azul, DAPI). La línea punteada separa la capa glomerular de la capa de fibras olfatorias. En verde se marcan 3 regiones (glomérulos) representativas. (C) Canal rojo (Cx43).

Capa de las fibras olfatorias. Se evaluaron los perfiles de inmunoreactividad desde el borde interno hacia el borde externo de la capa de las fibras olfatorias, donde se localiza la glía envolvente. Por cada foto se generaron al azar 3 regiones rectangulares de interés, de 15 μm de ancho (dimensión menor y paralela a las láminas del bulbo) y de largo suficiente para cubrir el espesor de la capa (Figura M.7). Dado que la inmunomarca contra las conexinas evaluadas es puntiforme, se cuantificó la densidad de partículas (*clusters*) de conexina en cada región. Para ello, se aplicó el algoritmo *triangle*, calculado automáticamente por el *software* imageJ (Figura

M.7) para convertir al canal correspondiente a la inmunomarca de conexina en una imagen binaria (Zack and Rogers, 1977). Sobre esta imagen se realizó la detección de partículas en cada región de interés, registrando su área y coordenada a partir del límite interno de la capa de las fibras olfatorias. Para realizar los perfiles de expresión de *clusters*, se agruparon las partículas en función de su coordenada, cada 10 μm desde el límite mencionado, sin considerar los tamaños de partícula que se detectaron también en los controles sin anticuerpo. Se excluyeron las partículas de tamaño $\leq 0.096 \mu\text{m}^2$ para las inmunofluorescencias realizadas en animales de la línea S100-GFP, y $\leq 0.192 \mu\text{m}^2$ para los animales de la línea cCx43KO.

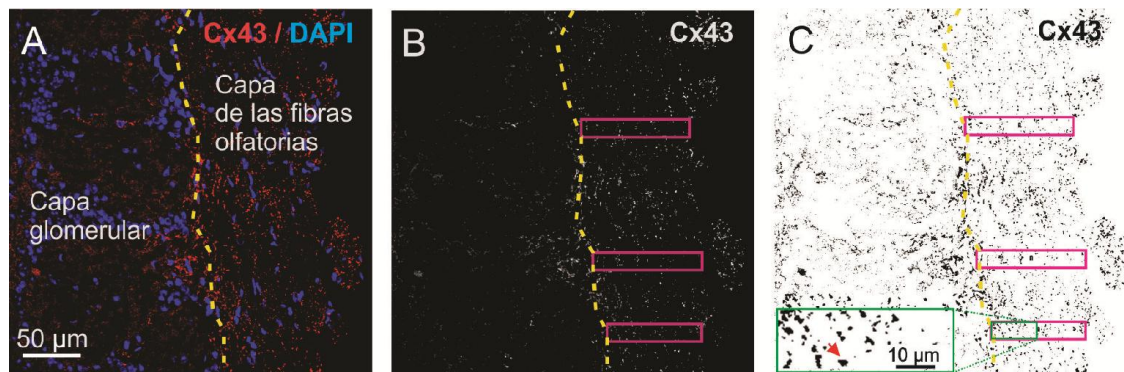


Figura M.7. Cuantificación de *clusters* de conexina en la capa de fibras olfatorias. (A) Inmunofluorescencia contra Cx43 en bulbo olfatorio (rojo) y marcación nuclear (azul, DAPI). La línea punteada separa la capa glomerular de la capa de fibras olfatorias. **(B)** Canal rojo (Cx43) con regiones de interés representativas. **(C)** Imagen binaria de B luego de aplicar el algoritmo triangle del *software* ImageJ. El recuadro en verde muestra en aumento una región de interés; la flecha roja señala un *cluster* de Cx43.

9.2 Análisis de marcadores de células de la glía envolvente

Este análisis se utilizó para cuantificar los marcadores S100B, BLBP y también para cuantificar la captura de BrEt por parte de las células de la glía envolvente. Primero se detectaron las partículas correspondientes a cada núcleo de la capa de fibras olfatorias (hasta $80 \mu\text{m}^2$), utilizando el canal correspondiente a DAPI, al cual se aplicó el algoritmo *Otsu* (Otsu, 1979) para obtener una imagen binaria. Luego se analizó la intensidad de la marca en el canal correspondiente al marcador de interés para cada partícula (núcleo) detectada y se construyó un histograma de intensidades para las partículas de cada foto (Figura M.8). Se ajustó cada distribución a una doble gaussiana y se consideraron positivas para el marcador las células con mayor intensidad que el valle de la doble gaussiana. Cuando se obtuvo un histograma de intensidades con un único máximo, se descartaron las partículas con marca menos intensa que el control negativo. El ajuste de las distribuciones se realizó con el *software* Originlab.

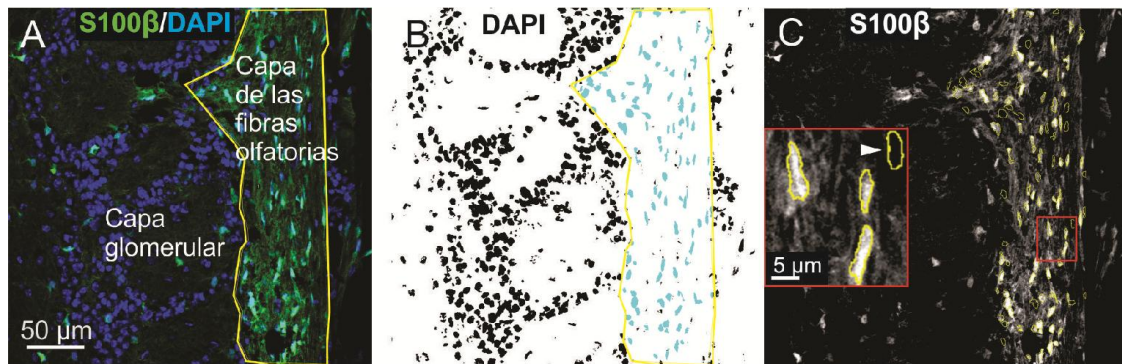


Figura M.8. Cuantificación de marcadores de la glía envolvente. (A) Expresión de GFP en la capa de fibras olfatorias de ratones S100B-GFP (verde) y marcación nuclear (azul, DAPI). La línea amarilla indica el área correspondiente a la capa de fibras olfatorias. (B) Aplicación del umbral *otsu* del *software* ImageJ al canal de DAPI y generación de las regiones de interés mediante el analizador de partículas. En celeste se observan las partículas (núcleos) detectadas por el *software*. (C) Transferencia de las partículas detectadas en B al canal verde S100B-GFP para el análisis de la intensidad de marca de cada partícula. En el recuadro se observan 3 partículas con alta intensidad de marca y la flecha indica una partícula de baja intensidad de marca.

9.3 Análisis de la inmunoreactividad contra c-fos y TH en el bulbo olfatorio

Se seleccionó el canal correspondiente a c-fos y se aplicó el algoritmo *RenyiEntropy* calculado automáticamente por el *software* ImageJ, para obtener una imagen binaria (Kapur et al., 1985). La imagen resultante extrajo como objetos a las células con marca más intensa, sin considerar la expresión basal (Figura M.9). Se cuantificó manualmente el número de células totales (núcleos marcados con DAPI) y el número de células positivas para c-fos, que se expresó como porcentaje. La cuantificación se realizó en la región ventro-medial del bulbo olfatorio.

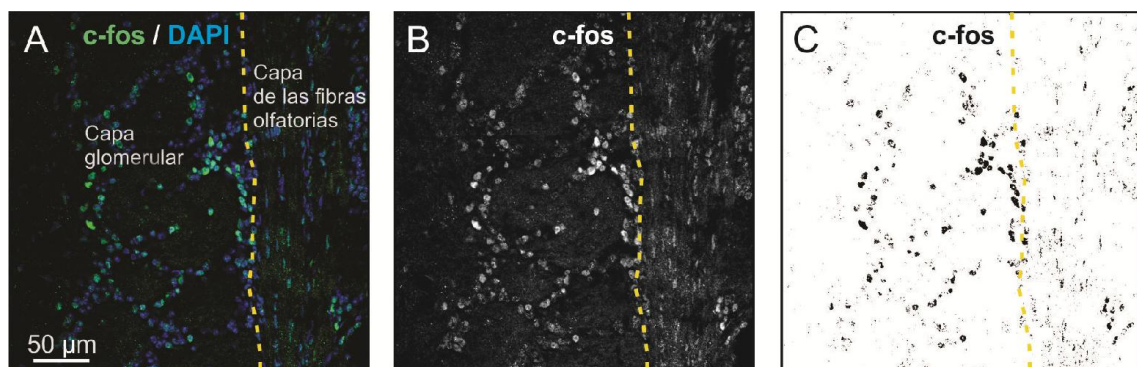


Figura M.9. Cuantificación de las interneuronas c-fos-positivas. (A) Inmunofluorescencia contra c-fos en bulbo olfatorio (verde) y marcación nuclear (azul, DAPI). La línea punteada separa la capa glomerular de la capa de fibras olfatorias. (B) Canal verde (c-fos). (C) Imagen binaria de B luego de aplicar el algoritmo *RenyiEntropy* del *software* ImageJ.

El número de células positivas para TH en la capa glomerular del bulbo se cuantificó manualmente y se expresó como porcentaje de núcleos totales, también contados manualmente.

9.4 Análisis de la inmunoreactividad contra GAP-43 y OMP en epitelio olfatorio

El número total de células (marcadas con DAPI) y el de células positivas para cada marcador neuronal se cuantificó manualmente. Los valores se expresaron como número de células en 100 μm^2 de epitelio olfatorio.

10. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se detallan en los epígrafes de las figuras y se realizaron con los *softwares* Graphpad Prism 6 y STATISTICA 8.0. En los casos en que se usaron *tests* paramétricos primero se verificó que los datos cumplieran los criterios de normalidad y homocedacea. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$, y en todos los casos se muestra Media \pm EE, salvo que se indique lo contrario. Todos los experimentos se realizaron en al menos dos experimentos independientes, a menos que se indique lo contrario.

Resultados

Resultados: Parte 1

Modulación de conexinas y marcadores biofísicos de conectividad en la glía envolvente durante la degeneración/regeneración inducida al epitelio olfatorio

La regeneración y recuperación funcional del epitelio olfatorio luego del daño depende del grado de extensión de la lesión y de la presencia de células con la capacidad de proliferar (Jang et al., 2003; Leung et al., 2007). Las células de la glía envolvente forman parte del entorno celular cercano al nicho neurogénico del epitelio olfatorio, y están asociadas a los axones de las neuronas sensoriales en toda su extensión. En estudios realizados después de una axotomía al nervio olfatorio, se observó que estructuralmente la glía envolvente continúa formando los canalículos por donde discurren normalmente los axones de las neuronas sensoriales, tanto durante la degeneración como en la regeneración del nervio olfatorio (Li et al., 2005; Williams et al., 2004). Este resultado sugiere que la glía envolvente no presenta cambios ante el daño, sin embargo, se desconoce si esta glía acompaña la remodelación del nervio ante el daño mediante alteraciones funcionales.

En una variedad de condiciones patológicas e injurias, la comunicación por *gap junctions* de las redes gliales es modulada positiva o negativamente dependiendo del tipo de lesión y correlaciona con alteraciones en la expresión de conexinas (Chanson et al., 2005; Karpuk et al., 2011). En esta sección estudiamos si durante la degeneración/regeneración inducida al epitelio olfatorio se modifican la expresión de conexinas y propiedades electrofisiológicas relacionadas con la conectividad.

1.1 Reproducción del modelo de daño reversible al epitelio olfatorio inducido por el tratamiento con metimazol

Para inducir el daño al epitelio olfatorio utilizamos el modelo de lesión por tratamiento con la droga anti-tiroidea metimazol (MMZ), de efecto secundario olfatotóxico (Hallman and Hurst, 1953).

El curso temporal de cambios histopatológicos del epitelio olfatorio por el tratamiento con MMZ fue bien caracterizado (Bergman et al., 2002; Booker-Dwyer et al., 2008; Suzukawa et al., 2011). Para evaluar su reproducibilidad bajo nuestras condiciones experimentales, los ratones se trataron con MMZ o su vehículo salina (control), y a los 5, 15 y 30 días después del tratamiento se evaluó la morfología y composición celular del epitelio olfatorio (Figura R1.1.A y B). Para los animales tratados con salina, el espesor del epitelio se mantuvo invariable, y la inmunoreactividad contra los marcadores de estadio de maduración del linaje neuronal GAP-43 (neuronas

inmaduras) y OMP (neuronas maduras), fue semejante en todos los tiempos evaluados (Figura R1.1.C-E).

Para los animales tratados con MMZ, a los 5 y 15 días después del tratamiento, se observó la reducción en el espesor del epitelio, con respecto al grupo control, y únicamente se distinguieron neuronas inmaduras (Figura R1.1.F y G). En contraste, 30 días después del tratamiento con MMZ, el espesor y la composición del epitelio se encontró semejante a la condición control, consistente con la recuperación histológica del mismo (Figura R1.1.H).

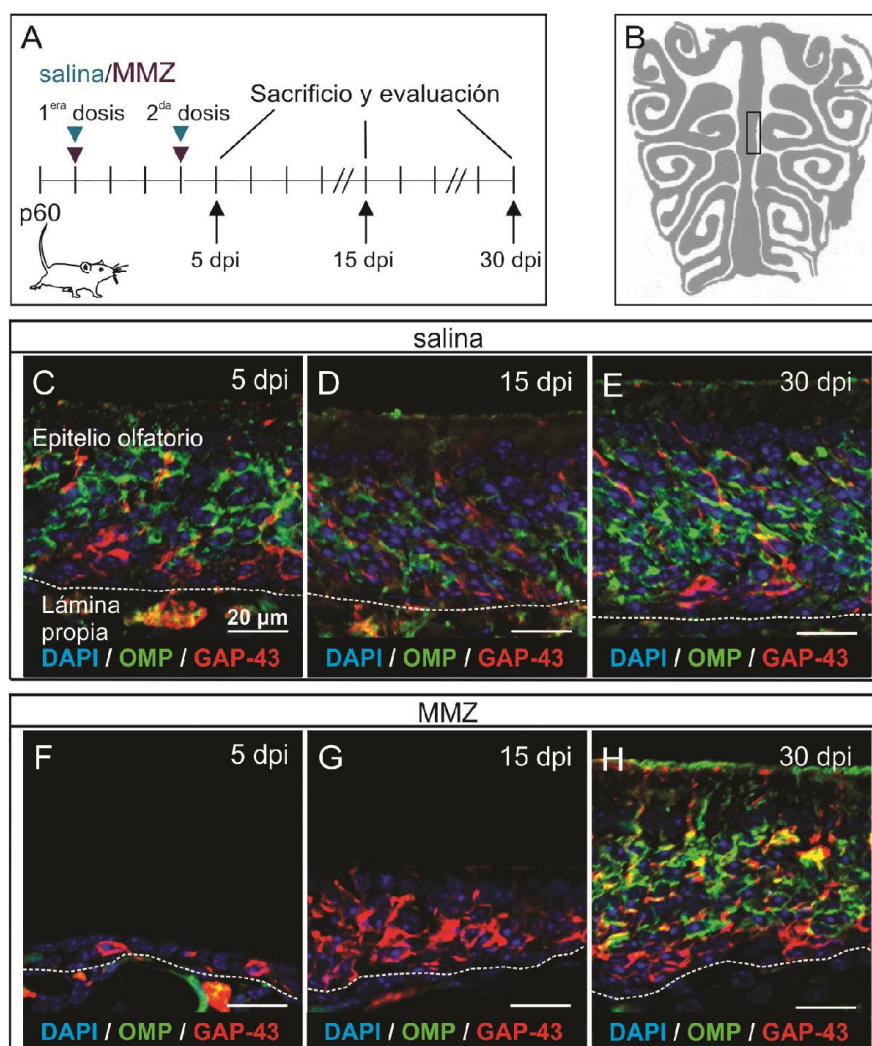


Figura R1.1. Daño reversible al epitelio olfatorio inducido por el tratamiento con metimazol. (A) Diseño experimental (ver detalle en materiales y métodos). Los animales fueron tratados con MMZ o su vehículo (salina) y evaluados a los tiempos indicados. **(B)** Esquema de corte coronal de nariz; el recuadro indica la región del *septum* donde se capturaron las imágenes. Se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra el marcador de neuronas sensoriales inmaduras, GAP-43 (rojo) y el marcador de neuronas sensoriales maduras, OMP (verde) en secciones de epitelio olfatorio de ratones control tratados con salina (**C-E**) o tratados con MMZ (**F-H**). dpi: días post-inyección de salina o MMZ.

Estos resultados sugieren la reproducibilidad, bajo nuestras condiciones experimentales, de los datos publicados y amplían la caracterización del curso temporal de recuperación

histológica del modelo de daño reversible al nervio inducido por dos dosis de MMZ. Para este protocolo la recuperación no había sido caracterizada entre los 2 y los 12 días del tratamiento y si bien se disponía de datos sobre la expresión de GAP-43, la expresión de OMP no estaba reportada (Bergman et al., 2002; Booker-Dwyer et al., 2008).

La degeneración inducida por el tratamiento con MMZ se asoció con una función olfativa deficiente en numerosos ensayos conductuales, recuperándose a los 30-45 días después del tratamiento, consistente con el curso temporal de la regeneración del epitelio (Blanco-Hernández et al., 2012; Genter et al., 1996; Xu and Slotnick, 1999). Para confirmar la recuperación de la función olfativa inducida por el tratamiento con MMZ a la dosis usada, evaluamos el desempeño conductual de los ratones en un ensayo de habituación-deshabitación a estímulos olfativos, antes y después del tratamiento con MMZ (Figura R.1.2).

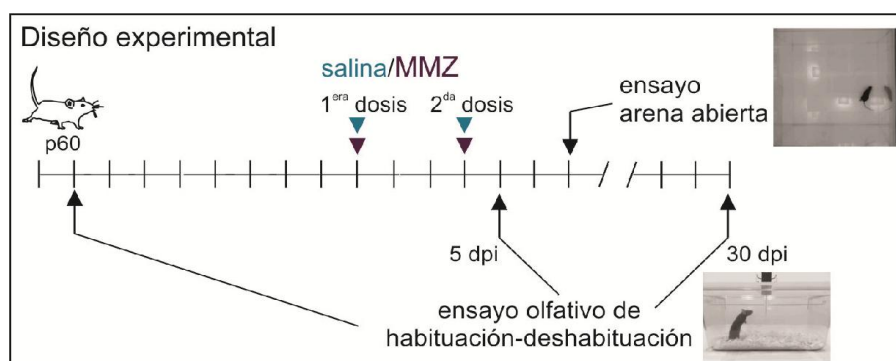


Figura R1.2. Diseño para la caracterización conductual del modelo de daño reversible al epitelio olfatorio. Los ratones adultos se evaluaron en un ensayo olfativo de habituación-deshabitación una semana antes del tratamiento con salina o MMZ, y a los 5 y 30 días post-inyección (dpi). Se estudió la actividad locomotora en una arena abierta a los 7 dpi.

En el ensayo olfativo de habituación-deshabitación se estudió el tiempo que los ratones olfatearon voluntariamente un hisopo impregnado en solución con odorante (tiempo de *sniffing*) para 5 estímulos olfativos presentados consecutivamente, 3 veces cada uno (Figura R1.3 A y B). Como se esperaba, previo a su tratamiento con salina o MMZ, no se observaron diferencias entre los grupos experimentales en el desempeño olfativo para ninguno de los estímulos presentados (Figura R1.3.C). En este ensayo, se observa el comportamiento esperado, ya que los animales olfatean cada estímulo durante un cierto tiempo ante la primera presentación y luego reducen el tiempo de olfato (habitución). Al presentarse un estímulo distinto, el tiempo de exploración olfativa aumenta (deshabitación). Consistente con la degeneración del epitelio a los 5 días del tratamiento con MMZ (Figura R1.1.F), los animales mostraron una reducción respecto del grupo control tratado con salina, en el tiempo de *sniffing* para la primera presentación del olor artificial coco y el olor social correspondiente al sexo opuesto (Figura R1.1.3.D). Estos resultados sugieren la detección deficiente de estos estímulos olfativos en los animales tratados con MMZ.

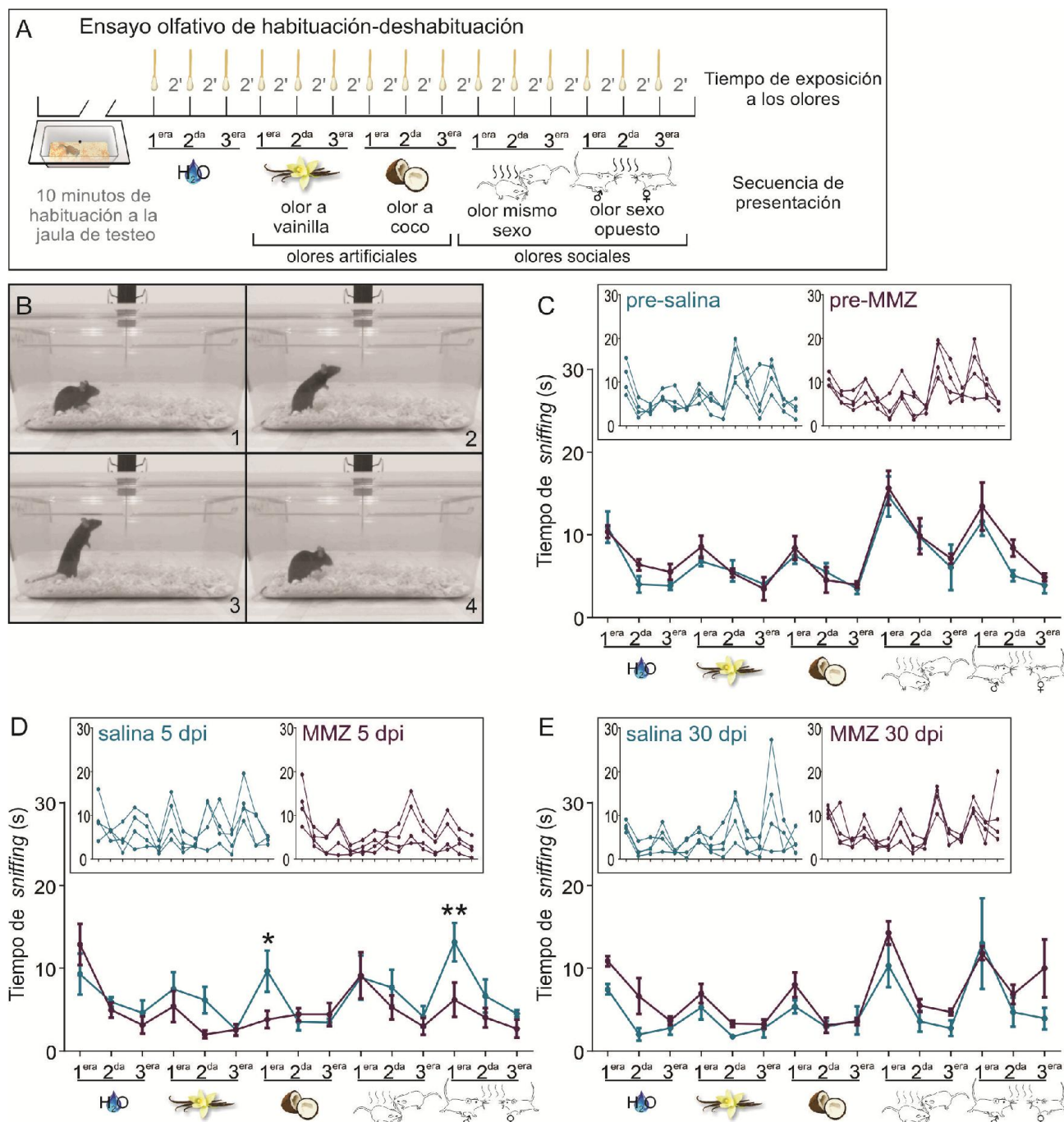


Figura R1.3. Efecto del daño al epitelio olfatorio sobre el desempeño en un ensayo olfativo de habituación-deshabitación. (A) Protocolo experimental. **(B)** Imágenes secuenciales representativas de la conducta de exploración olfativa (*sniffing*) ante la presentación de un hisopo impregnado con el estímulo. **(C-E)** Tiempo total de *sniffing* para cada presentación del estímulo antes **(C)**, y a los 5 **(D)** y 30 días **(E)** del tratamiento con salina/MMZ. Los datos se muestran como la media \pm EE. Los recuadros muestran los valores individuales. ANOVA de dos vías (factores: estímulo y tratamiento) con medida repetida para el estímulo, con prueba posterior de la diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher; (C y E) interacción: $p > 0.05$, efecto del estímulo: $p < 0.0001$, efecto del tratamiento: $p > 0.05$; (D) interacción: $p < 0.01$, efecto del estímulo: $p < 0.0001$, efecto del tratamiento: $p > 0.05$, comparación *post-hoc*: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Los grupos no mostraron diferencias en el tiempo de *sniffing* del primer estímulo presentado, agua, que representa un estímulo novedoso, debido a que es la primera vez que

durante el ensayo se presenta el hisopo, pero que es esencialmente neutro en cuanto a su componente olfativo. De los cuatro olores seleccionados para el ensayo, el olor artificial coco y el olor social correspondiente al sexo opuesto fueron suficientemente sensibles para detectar deficiencias olfativas, mientras que vainilla y el olor social correspondiente al mismo sexo no fueron explorados de manera diferente por los animales control y los tratados con MMZ. Aún así, el ensayo en su conjunto fue informativo para evaluar el impacto del daño inducido por el tratamiento con MMZ sobre la función olfativa y sobre la dinámica de la recuperación.

Luego de 30 días del tratamiento con salina ó MMZ, no se observaron diferencias entre los tratamientos en el tiempo de *siniffing* para ninguno de los estímulos olfativos presentados (Figura R1.3.E). Este resultado es consistente con la recuperación histológica observada a este tiempo (Figura R1.1.H) y con la recuperación funcional reportada (Blanco-Hernández et al., 2012; Genter et al., 1996).

Para descartar que las diferencias observadas en el ensayo de habituación-deshabitación se deban a una actividad locomotora y/o a una componente de ansiedad diferencial por el tratamiento con MMZ, se realizó el ensayo conductual de exploración de una arena abierta dos días después del tiempo al que se observó el déficit en la función olfativa de los animales tratados con MMZ. La distancia total recorrida y la velocidad máxima no mostraron diferencias entre los grupos (Figura R1.4. A-C). Además, evaluamos la exploración del área de la arena alejada de las paredes, definida como centro, poco explorada en animales con niveles de ansiedad elevados. Tanto el tiempo de permanencia en el centro, como el porcentaje de la distancia total recorrida en esta área, fueron indistinguibles entre los animales control y los tratados con MMZ (Figura R1.4D-E). Además la reducción de la distancia recorrida en función del tiempo del ensayo, que se interpreta como habituación a la arena, tampoco difirió entre los grupos (Figura R1.4.F). Estos resultados indican que el pobre desempeño en el ensayo olfativo de los animales luego de 5 días de su tratamiento con MMZ, no se encuentra asociado a un déficit locomotor o una componente de ansiedad exacerbada.

En consistencia con lo reportado, bajo nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con MMZ indujo la degeneración reversible del epitelio olfatorio y una hiposmia transiente. Este resultado representa un requisito para poder utilizar el tratamiento con MMZ como modelo para estudiar si la degeneración/regeneración del epitelio olfatorio se acompaña de la remodelación de las redes de glía asociadas al nervio.

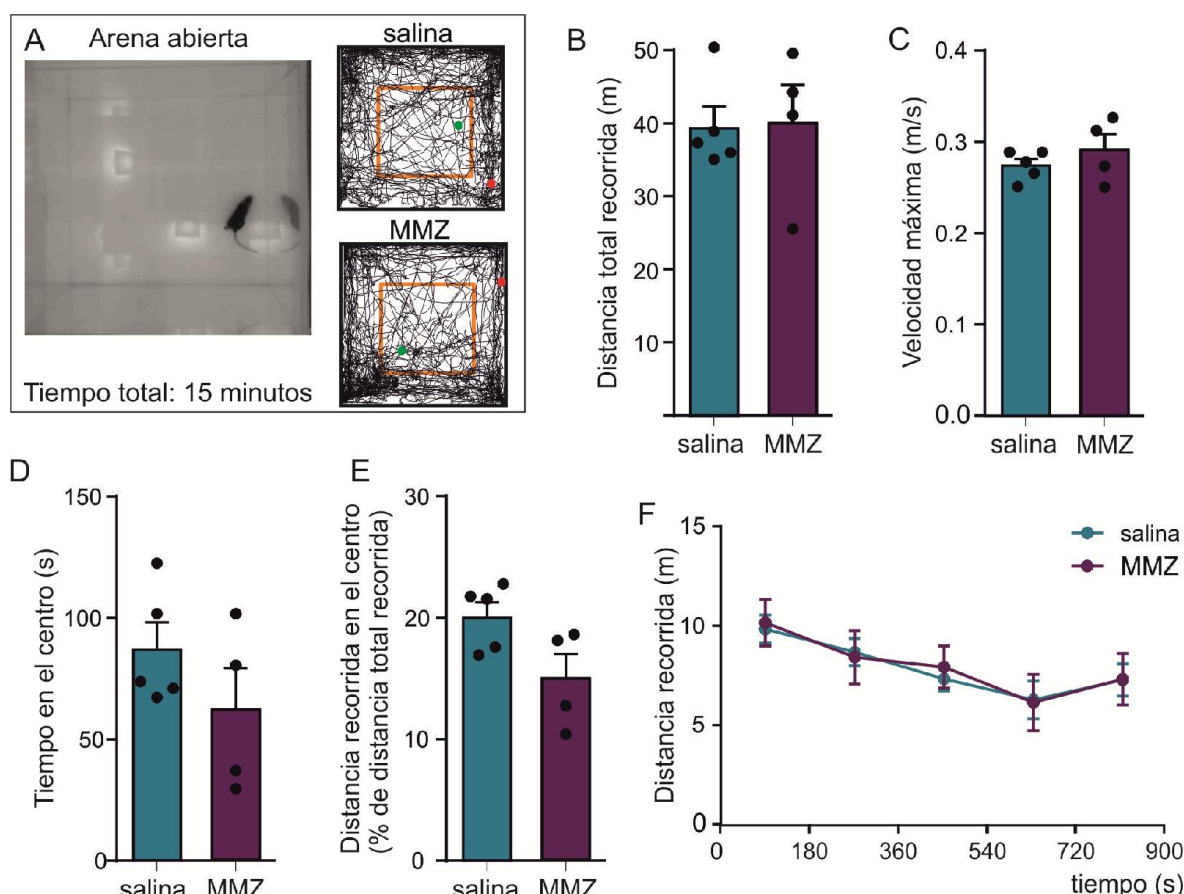


Figura R1.4. Efecto del daño al epitelio olfatorio sobre la conducta locomotora en el ensayo de arena abierta (*open field*). (A) Trayectoria representativa en la arena abierta de un ratón control (salina) y uno con daño al epitelio olfatorio (MMZ). Los puntos, verde y rojo, indican la ubicación del ratón al inicio y al final del ensayo, respectivamente. (B) Cuantificación de la distancia total recorrida, (C) la velocidad máxima adquirida, (D) el tiempo recorrido en la región central de la arena, (E) el porcentaje de la distancia recorrida en el centro y (F) la curva de distancia recorrida versus tiempo. Los datos se muestran como la media \pm EE. (B-E) Prueba no paramétrica (Mann-Whitney): $p > 0.05$. (F) ANOVA de dos vías (factores: tratamiento y tiempo) con medida repetida para el tiempo, interacción: $p > 0.05$, efecto del tiempo: $p < 0.0001$, efecto del tratamiento: $p > 0.05$.

1.2 La degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ se asocia con una reducción en la expresión de Cx43 en la glía envolvente

La remodelación de redes astrocíticas involucra alteraciones en la expresión de conexinas que dependen del tipo de daño en cuestión (Haupt et al., 2007; Karpuk et al., 2011). Para evaluar si la degeneración/regeneración del epitelio olfatorio se asocia con una modulación en la expresión de conexinas en la glía envolvente, estudiamos la inmunomarcación contra Cx43, la principal conexina expresada por esta glía (Rela et al., 2010), en la capa más externa del bulbo olfatorio (la capa de las fibras olfatorias), donde la glía envolvente representa la mayoría de las células gliales (Au et al., 2002).

Debido a que a los 30 días después del tratamiento con MMZ observamos la recuperación histológica y funcional del sistema, nos enfocamos en estudiar los tiempos previos a dicha recuperación. Utilizamos tejido obtenido a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina o MMZ (Figura R1.5.A-F).

La capa de fibras olfatorias presenta una organización sub-laminar: la capa interna o profunda, cercana a la capa glomerular y la capa externa o superficial. En animales juveniles, la Cx43 presenta un gradiente de expresión que decae desde la capa interna a la externa (Rela et al., 2015). Debido a que además la marca para Cx43 es puntiforme, se evaluó la densidad de *clusters* de Cx43 desde el borde interno hacia el borde externo de la capa de las fibras olfatorias (ver detalle del análisis en materiales y métodos, sección 9.1). En los animales adultos usados en estos experimentos no observamos un gradiente marcado en la expresión de Cx43 desde la zona interna hacia la externa de la capa de las fibras olfatorias (Figura R1.5.G y H), por lo tanto se redujo un factor en el análisis promediando los datos a lo largo de la distancia. En los animales tratados con MMZ se observó una reducción en la densidad de *clusters* de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias con respecto al grupo control (Figura R1.5.I). De manera inesperada, observamos que, en contraste a lo observado para la capa de fibras olfatorias, en la capa glomerular el tratamiento con MMZ se asoció con un aumento de la inmunoreactividad contra Cx43 respecto del grupo control (Figura R1.5.J).

Estos resultados indican que durante la degeneración/regeneración del epitelio olfatorio inducida por MMZ, la expresión de Cx43 es modulada diferencialmente en las capas del bulbo olfatorio. Esta modulación diferencial se pone de manifiesto por una reducción de la expresión de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias, predominantemente expresada por la glía envolvente, y su aumento en la capa glomerular (probablemente en astrocitos).

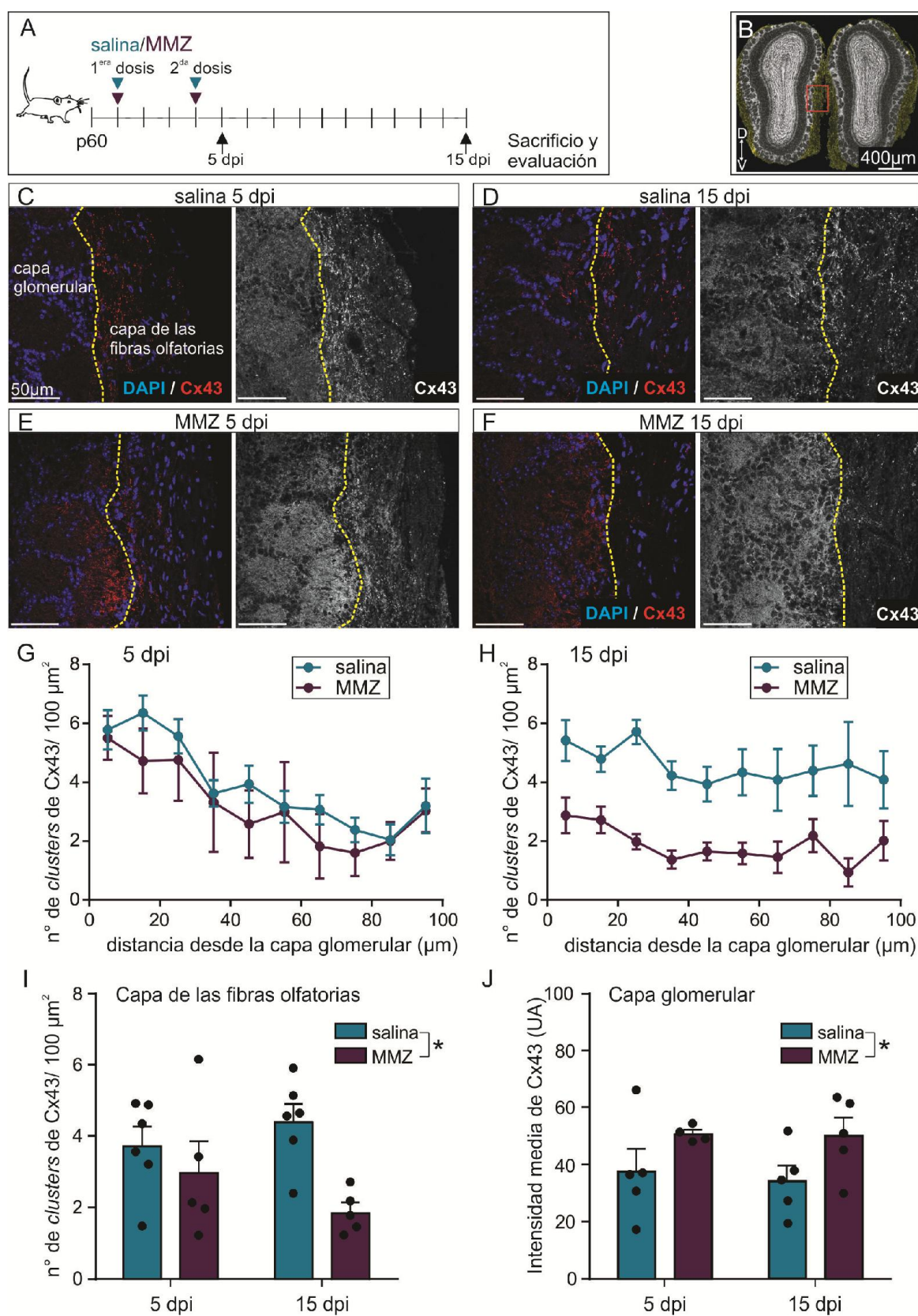


Figura R1.5. Expresión de Cx43 en el bulbo olfatorio de ratones con daño al epitelio olfatorio. (A) Diseño experimental. Los animales fueron tratados con MMZ o su vehículo (salina) y evaluados a los tiempos indicados. **(B)** Corte coronal de bulbo olfatorio mostrando la capa de las fibras olfatorias (esquemática en amarillo). El recuadro indica la zona donde se capturaron las imágenes. **(C-F)** Inmunofluorescencia contra Cx43 (rojo) en el bulbo olfatorio a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina/MMZ. La marca nuclear se muestra en azul y la línea punteada indica la interfase entre la capa glomerular y la capa de las fibras olfatorias. **(G y H)** Densidad de *clusters* de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias en función de la distancia desde el límite externo de la capa glomerular, a los 5 (G) y 15 días (H) después del tratamiento con salina/MMZ. **(I)** Densidad de *clusters* de Cx43 en la capa de fibras olfatorias a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina/MMZ. **(J)** Intensidad promedio de la inmunomarcación contra Cx43 en la capa glomerular a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina/MMZ. Se muestra la media \pm EE. (I y J) ANOVA de dos vías (factores: tratamiento y tiempo); interacción: $p > 0.05$; efecto del tratamiento: $*p < 0.05$; efecto del tiempo: $p > 0.05$.

1.3 La Cx30 no compensa la reducción en la expresión de Cx43 observada en la capa de las fibras olfatorias por el tratamiento con MMZ

La reducción de Cx43 en la glía envolvente podría estar compensada por otras conexinas. Se estudió la inmunoreactividad contra Cx30, que típicamente compensa la ausencia de Cx43 en los astrocitos (Rouach et al., 2008). La cuantificación de *clusters* de Cx30 en la capa de las fibras olfatorias, no reveló diferencias entre los grupos experimentales, para ninguno de los tiempos estudiados después del tratamiento (Figura R1.6.A-G). Sin embargo, en la capa glomerular se observó el aumento, respecto del grupo control, de la intensidad promedio de inmunomarcación contra la Cx30 a los 5 días después del tratamiento con MMZ (Figura R1.6.H). En contraste, a los 15 días, los niveles de marcación contra Cx30 en la capa glomerular no difirieron entre los grupos experimentales.

Estos resultados indican que la reducción en la expresión de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias, no es compensada por la expresión de Cx30, y en contraste a la Cx43, la Cx30 no es modulada por el tratamiento con MMZ en esta capa. Por otra parte, la expresión de Cx30 en la capa glomerular es sensible a eventos tempranos después del tratamiento con MMZ, posiblemente asociados con la muerte de las neuronas sensoriales.

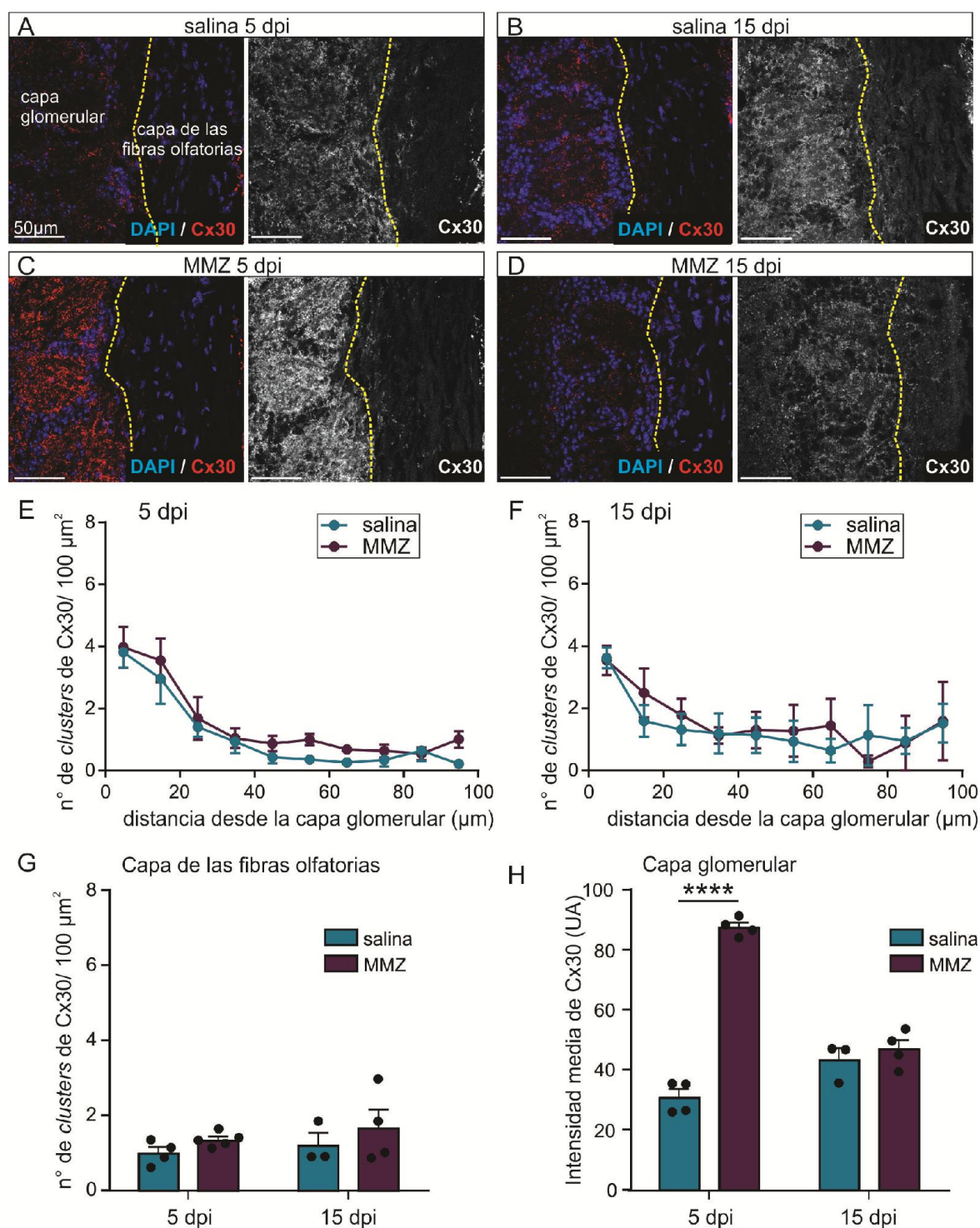


Figura R1.6. Expresión de Cx30 en el bulbo olfatorio de ratones con daño al epitelio olfatorio. (A-D) Inmunofluorescencia contra Cx30 (rojo) en el bulbo olfatorio a los 5 y 15 después del tratamiento con salina/MMZ. La marca nuclear se muestra en azul y la línea punteada indica la interfase entre la capa glomerular y la capa de las fibras olfactorias. **(E y F)** Densidad de *clusters* de Cx30 en la capa de las fibras olfactorias en función de la distancia desde el límite externo de la capa glomerular, a los 5 (E) y 15 días (F) después del tratamiento con salina/MMZ. **(G)** Densidad de *clusters* de Cx30 en la capa de fibras olfactorias a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina/MMZ. **(H)** Intensidad promedio de la inmunomarcación contra Cx30 en la capa glomerular a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina/MMZ. Se muestra la media \pm EE. (G) ANOVA de dos vías (factores: tratamiento y tiempo); interacción: $p > 0.05$; efecto del tratamiento: $p > 0.05$; efecto del tiempo: $p > 0.05$. (H) ANOVA de dos vías (factores: tratamiento y tiempo), con prueba a posteriori de Bonferroni; interacción: $p < 0.0001$; efecto del tratamiento: $p < 0.0001$; efecto del tiempo: $p < 0.001$; prueba a posteriori de Bonferroni: **** $p < 0.0001$.

1.4 La degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ se asocia con el aumento de las células S100B+ en la capa de las fibras olfatorias

La reducción en la expresión de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias observada a los 5 y 15 días después del tratamiento con MMZ, podría deberse a la disminución en el número de células de la glía envolvente, en lugar de la modulación de la expresión de esta conexina. Para descartar esta posibilidad, evaluamos la densidad de células que expresan S100B (expresado por la glía envolvente) en la capa de las fibras olfatorias, a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina o MMZ (Figura R1.7. A-D).

Los animales usados (S100B-GFP) reportan la glía envolvente mediante expresión de GFP. En estos animales, tratados con MMZ, se observó el aumento, respecto del grupo control, de la densidad de células que expresan S100B en la capa de las fibras olfatorias (Figura R1.7.E). Inclusive, el análisis de la densidad de núcleos presentes en esta capa, reveló que dicho aumento se encuentra asociado al incremento de la densidad nuclear de la capa (Figura R1.7.F). Por lo tanto, la degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ se acompaña por la presencia de nuevas células que expresan S100B en la capa de las fibras olfatorias, posiblemente glía envolvente o astrocitos. Este resultado es consistente con un estudio previo que muestra la proliferación de la glía envolvente después de una bulbectomía (Chehrehasa et al., 2012). Sin embargo, el aumento en la densidad de células S100B debido al tratamiento con MMZ (34% en promedio) no explica el incremento total de la densidad nuclear (42% en promedio). Resultados correspondientes a la tesis doctoral de un integrante del laboratorio, indican que el tratamiento con MMZ induce la proliferación de la microglía en la capa de las fibras olfatorias en ratones juveniles, lo cual es consistente con el aumento de la densidad de células negativas para S100B que indican los resultados aquí mostrados.

En resumen, nuestros resultados indican que la degeneración/regeneración del epitelio olfatorio inducida por el tratamiento con MMZ se asocia con una modulación negativa de la expresión de Cx43, que no se explica por una pérdida de células de la glía envolvente que la expresan.

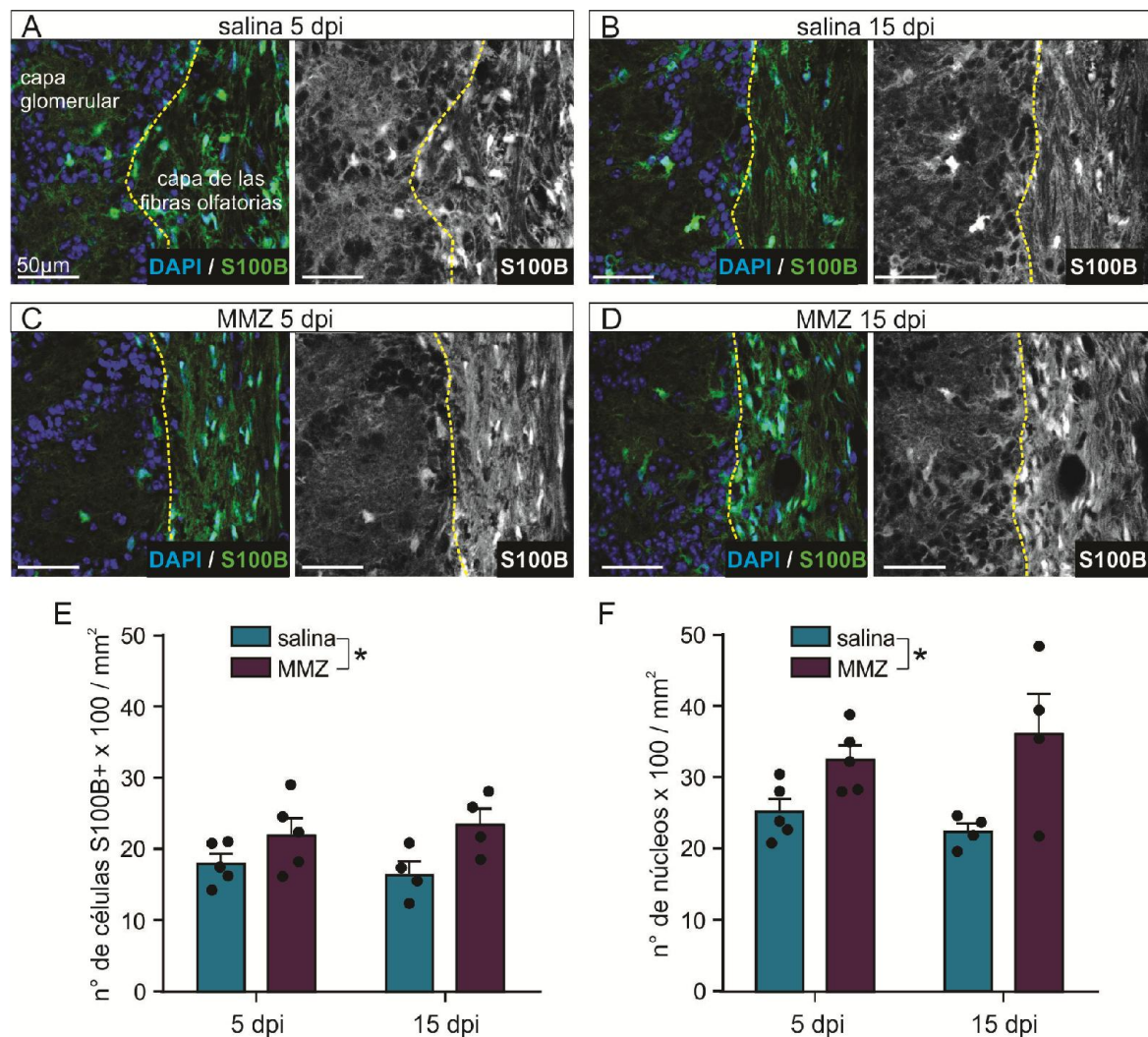


Figura R1.7. Densidad de células que expresan S100B en la capa de las fibras olfatorias del bulbo de ratones con daño al epitelio olfatorio. (A-D) Expresión de S100B (verde) en el bulbo olfatorio de ratones S100B-GFP a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina/MMZ. La línea punteada separa la capa glomerular de la capa de las fibras olfatorias. **(E)** Densidad de células positivas para S100B (S100B+) en la capa de las fibras olfatorias. **(F)** Densidad de núcleos en la capa de las fibras olfatorias. Se muestra la media \pm EE. (E y F) ANOVA de dos vías (factores: tratamiento y tiempo); interacción: $p > 0.05$; efecto del tiempo: $p > 0.05$; efecto del tratamiento: $*p < 0.05$.

1.5 Regulación positiva de una corriente de membrana activable por despolarización en la glía envolvente durante la degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ

Las propiedades biofísicas de membrana de los astrocitos son moduladas luego de una injuria en el sistema nervioso central (Anderová et al., 2004; Bordey et al., 2001; Schroder et al., 1999). Se desconoce si, durante el proceso de degeneración/regeneración inducido por el tratamiento con MMZ, las propiedades electrofisiológicas de membrana de la glía envolvente son moduladas acompañando al nervio sometido a plasticidad. Para estudiar las propiedades biofísicas de membrana de las células de la glía envolvente en este contexto, se realizaron

registros electrofisiológicos de estas células, en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp*, en rodajas agudas de bulbo olfatorio de ratones a los 5 y 15 días del tratamiento con salina o MMZ, y se evaluaron las corrientes de membrana evocadas a distintos pulsos de voltaje (Figura R1.8.A).

Estudios previos mostraron que a la corriente total de membrana de la glía envolvente contribuyen diferentes conductancias dependiendo del rango de voltaje analizado (Rela et al., 2015). La conductancia de canales de potasio del tipo *inward rectifier* (K_{ir}) es máxima a -140 mV, mientras que a valores despolarizados no se encuentran activos. La conductancia de canales de potasio del tipo *delayed rectifier* (K_{DR}) es máxima a 80 mV, mientras que a valores hiperpolarizados no se encuentran activos. La conductancia dependiente de conexinas se encuentra activa en un rango amplio de voltaje, pero puede medirse sin contaminación detectable de canales de potasio dependientes de voltaje a -20 mV. Se estudiaron estos tres valores de voltaje que permiten analizar los efectos del tratamiento con MMZ sobre las corrientes de membrana descritas en células de la glía envolvente.

Mientras que a -140 mV no se observaron diferencias en la amplitud de corriente entre los grupos experimentales, a -20 y 80 mV, las células de la glía envolvente de ratones tratados con MMZ mostraron un aumento en la corriente de membrana evocada, respecto del grupo control (Figura R1.8.B). La mayor dispersión de los datos observada en la población de células provenientes de animales tratados con MMZ sugiere que el efecto global se debe al aumento de la corriente de membrana de una subpoblación de células que responde a la lesión.

La corriente de membrana emergente observada a -20 y 80 mV en los animales tratados con MMZ, es principalmente compatible con la modulación positiva de canales K_{DR} y/o canales de conexina (ya sea como hemicanales o formando *gap junctions*).

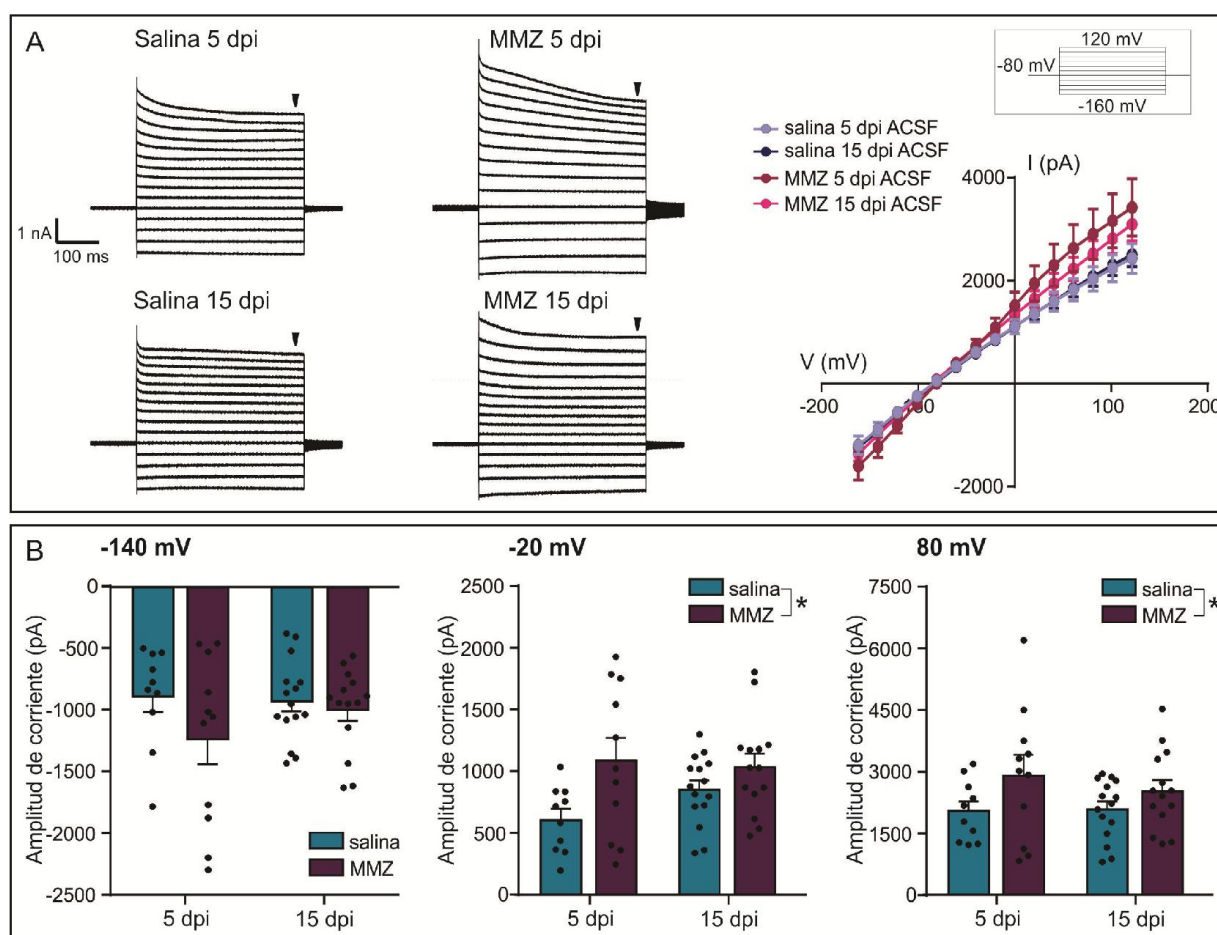


Figura R1.8. Perfiles de corriente de membrana de la glía envolvente de ratones con daño al epitelio olfatorio. (A) Registros representativos de la corriente total de membrana evocada en células de la glía envolvente, por los pulsos de voltaje indicados en el recuadro (fijación de voltaje en configuración *whole cell*) a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina/MMZ. A la derecha de los registros se observan las curvas de corriente versus voltaje (I/V) correspondientes. (B) Amplitud de la corriente evocada a los pulsos de voltaje de interés: -140, -20, y 80 mV, de izquierda a derecha respectivamente. Se muestra la media \pm EE. (B) ANOVA de dos vías (factores: tiempo y tratamiento); interacción: $p > 0.05$; efecto del tiempo: $p > 0.05$; efecto del tratamiento: $*p < 0.05$.

Para evaluar el efecto del tratamiento con MMZ sobre la corriente mediada por conexinas, la aislamos mediante la aplicación del bloqueante farmacológico ácido meclofenámico (MFA), aplicado con el sistema de perfusión durante el registro. Se evaluó la amplitud de la corriente evocada por los pulsos de voltaje antes y después del agregado de este bloqueante en células de la glía envolvente de ratones tratados con salina o MMZ (Figura R1.9.A). Debido a que el factor tiempo post-tratamiento no presentó diferencias en los análisis previos, no se tuvo en cuenta para estos análisis. Evaluamos la amplitud de la corriente sensible a MFA evocada por los pulsos de voltaje de -20 mV y 80 mV, en los que previamente observamos aumento de la corriente total. Ni la amplitud de la corriente sensible a MFA, ni el porcentaje de inhibición de la corriente total, difirieron entre los grupos (Figura R1.9.B y C). Este resultado muestra que, a pesar de que la corriente de membrana total aumenta en las células de la glía envolvente de los animales

lesionados, la sensibilidad al MFA no presenta cambios que alcancen la significancia estadística, sugiriendo que la corriente adicional no corresponde a canales de conexina. Esto es consistente con la reducción en la expresión de Cx43 sin compensación por Cx30 observada en los animales con daño al epitelio olfatorio.

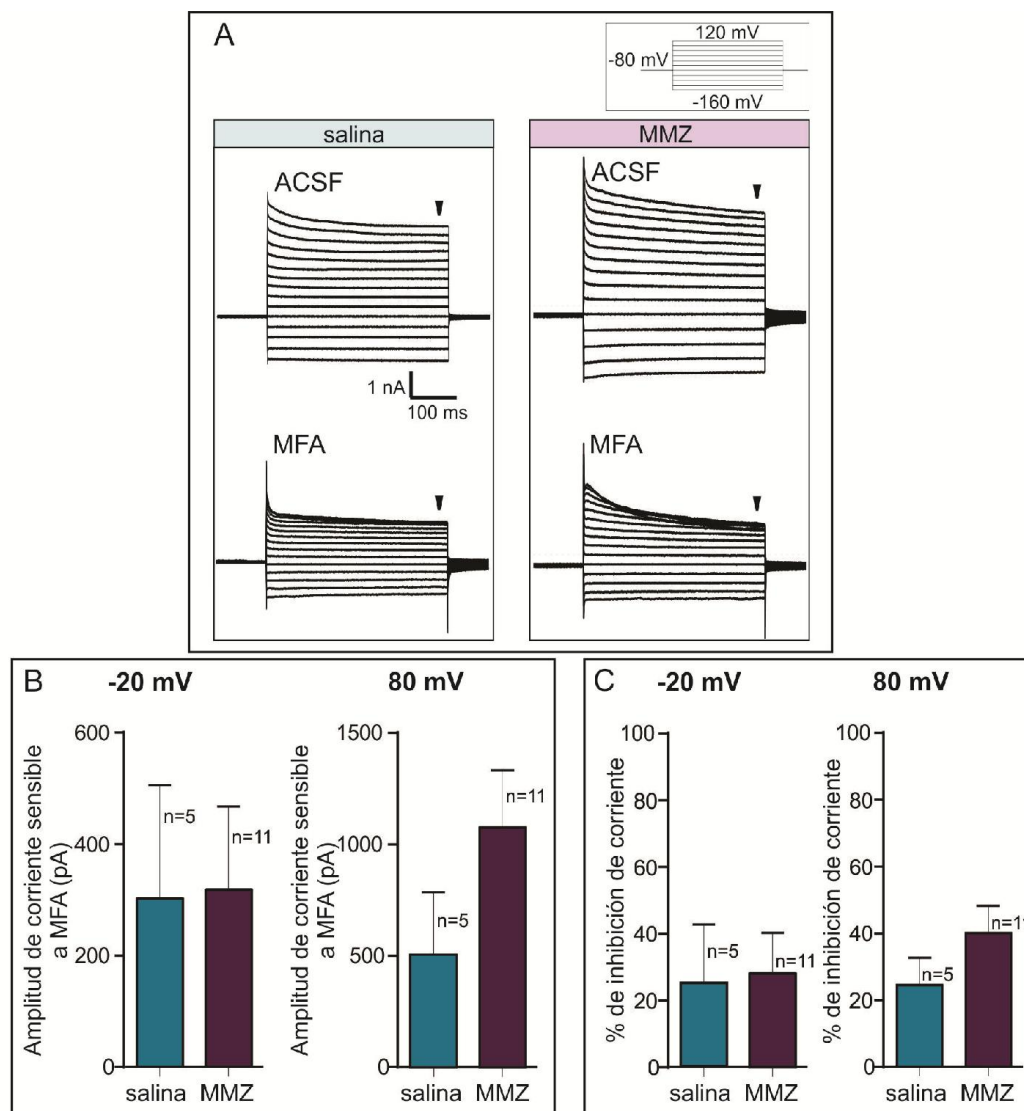


Figura R1.9. Sensibilidad de la corriente de membrana al ácido meclofenámico en la glía envolvente de ratones con daño al epitelio olfatorio. (A) Registros representativos de la corriente de membrana evocada por los pulsos de voltaje indicados en el recuadro (fijación de voltaje en configuración *whole cell*), de células de la glía envolvente de ratones tratados con salina/MMZ, antes y después del agregado de 100 μ M de MFA (bloqueante de conexinas). (B) Amplitud de la corriente sensible a MFA evocada a los voltajes de interés: -20 y 80 mV, de izquierda a derecha respectivamente. (C) Porcentaje de inhibición de corriente debido a la perfusión con MFA a los voltajes de interés: -20 y 80, de izquierda a derecha respectivamente. Se muestra la media \pm EE. Prueba no paramétrica (Mann-Whitney): $p > 0.05$.

1.6 La captura de bromuro de etidio por la glía envolvente durante la degeneración/regeneración inducida por MMZ no difiere de la condición control

La contribución de las conexinas a la corriente total de membrana se da tanto vía la formación de *gap junctions* con células vecinas, como por la formación de hemicanales que comunican con el medio externo. Nos preguntamos si la funcionalidad de hemicanales en la glía envolvente se ve disminuida por la lesión. Numerosos trabajos sostienen que la captura celular de bromuro de etidio (BrEt) presente en el medio extracelular es una medida de la función de hemicanales de conexinas o panexinas (Giaume et al., 2012; Roux et al., 2015). De forma exploratoria, evaluamos la captura de BrEt por las células de la glía envolvente en rodajas agudas de bulbo olfatorio de ratones a los 5 y 15 días después del tratamiento con salina o MMZ. El análisis de la intensidad promedio de BrEt capturado por la glía envolvente, no mostró diferencias entre los grupos experimentales (Figura R1.10), sugiriendo que la funcionalidad de los hemicanales no es modulada durante la degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ. De acuerdo con la reducción en la expresión de Cx43 y la ausencia de compensación por Cx30, sería esperable una disminución en la captura de BrEt por la glía envolvente de los animales tratados con MMZ, sin embargo, los experimentos no apoyaron esta predicción.

Para evaluar si la captura de BrEt estaba efectivamente ocurriendo vía canales de conexina, exploramos si la incubación con MFA, previamente a la incubación con BrEt, se asocia con una reducción en la captura de BrEt por la glía envolvente. Los resultados preliminares muestran que el MFA no afectó la captura de BrEt. Si bien estos resultados necesitan reforzarse, sugieren que la captura de BrEt por parte de la glía envolvente no es un buen indicador de la funcionalidad de hemicanales de conexina y que el colorante probablemente ingresa por otras vías (Figura R1.10, recuadro).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la reducción de la expresión de Cx43 no impacta significativamente en un indicador de la función de conexinas, tal como la sensibilidad al MFA de la corriente macroscópica de membrana. Resta evaluar si esto se debe a mecanismos compensatorios a nivel de la conductancia de canal único, a la redistribución de las conexinas remanentes entre compartimentos funcionales (en membrana plasmática versus en membrana de organelas celulares) o a la falta de sensibilidad de nuestros métodos.

Nuestros resultados también sugieren que la corriente de membrana emergente observada en las células de la glía envolvente durante la degeneración/regeneración inducida por el tratamiento con MMZ puede estar asociada a la modulación positiva de canales K_{DR} .

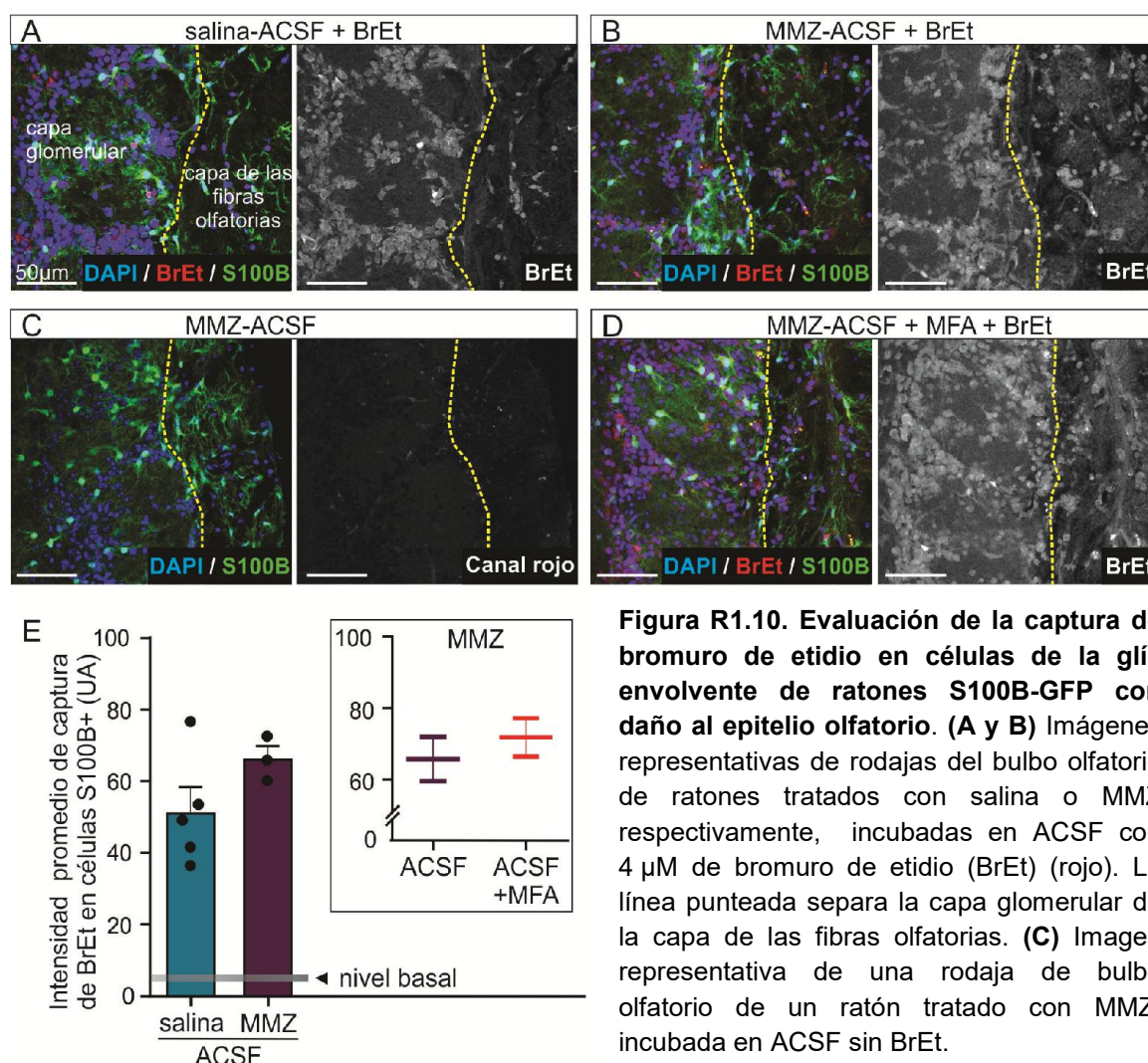


Figura R1.10. Evaluación de la captura de bromuro de etidio en células de la glía envolvente de ratones S100B-GFP con daño al epitelio olfatorio. (A y B) Imágenes representativas de rodajas del bulbo olfatorio de ratones tratados con salina o MMZ respectivamente, incubadas en ACSF con 4 µM de bromuro de etidio (BrEt) (rojo). La línea punteada separa la capa glomerular de la capa de las fibras olfatorias. **(C)** Imagen representativa de una rodaja de bulbo olfatorio de un ratón tratado con MMZ, incubada en ACSF sin BrEt.

(D) Rodaja de bulbo olfatorio de un ratón tratado con MMZ, incubada en ACSF con 4 µM de BrEt y 100 µM de MFA. **(E)** Captura promedio de BrEt por células S100B+ de la capa de las fibras olfatorias de ratones tratados con salina/MMZ (cada punto corresponde al promedio en un animal distinto). La línea gris indica la autofluorescencia promedio en células S100B+ de rodajas de bulbo olfatorio incubadas sin BrEt. El recuadro muestra la captura promedio de BrEt por células S100B+ en ausencia o presencia de MFA 100 µM en dos animales tratados con MMZ. Se muestra la media ± EE. Prueba no paramétrica de Mann-Whitney: $p > 0.05$.

En resumen, la degeneración/regeneración del epitelio olfatorio inducida por el tratamiento con MMZ se acompaña por la reducción en la expresión de Cx43 y la modulación positiva de una corriente de membrana activable por despolarización en la glía envolvente compatible con canales K_{DR} . En la glía glomerular, el tratamiento con MMZ se asocia con la regulación positiva de Cx43 y Cx30, esta última posiblemente acoplada a eventos tempranos de degeneración de las neuronas sensoriales, ya que su modulación no se sostiene en el tiempo.

Resultados: Parte 2

La ablación selectiva de conexina 43 en la glía envolvente se asocia con parámetros electrofisiológicos de desconexión

La glía envolvente puede formar redes de células conectadas por *gap junctions* y se caracterizaron indicadores biofísicos directos e indirectos de su grado de acople (Rela et al., 2010, 2015). Sin embargo, se desconoce el sustrato molecular que sostiene la conectividad mediada por *gap junctions* en la glía envolvente. Dado que la Cx43 es expresada por la glía envolvente y es la principal conexina expresada en la capa de las fibras olfatorias (Rela et al., 2010), es posible que la Cx43 medie la conectividad de esta glía.

En esta sección estudiamos el impacto de la delección selectiva de la Cx43 en la glía envolvente sobre las propiedades biofísicas de membrana de esta glía e indicadores biofísicos indirectos del acople de la red. Para abordar este objetivo, se utilizaron ratones genéticamente modificados que permiten la delección selectiva del gen que codifica para Cx43 en la glía envolvente, mediante la tecnología Cre-lox inducible por tamoxifeno.

2.1 El modelo de delección de Cx43 es efectivo y selectivo de la glía envolvente

Los animales experimentales se generaron como se indicó en detalle en materiales y métodos. Los ratones *knockout* condicionales para Cx43 (cCx43KO) se obtuvieron por el tratamiento de ratones adultos portadores de la doble modificación genética Cx43^{flox/flox};PLP-CreER^T con tamoxifeno. Por otra parte, los ratones portadores de una única modificación genética tratados con tamoxifeno, y los portadores de ambos transgenes tratados con vehículo constituyeron el grupo de controles. Los animales se sacrificaron para su evaluación 35 días después de la primera dosis de tamoxifeno o vehículo (Figura R2.1.A). Este tiempo se eligió porque supera ampliamente la vida media de las conexinas, estimada en una semana como máximo (Saez et al., 2003) y porque es además adecuado para evaluar posibles efectos de la delección de Cx43 sobre la incorporación de las neuronas nuevas al circuito olfatorio, cuya maduración podría demorar de 10-30 días desde su nacimiento (Jia et al., 2009). Este segundo aspecto se aborda en Resultados: Parte 3.

Para evaluar la efectividad del modelo para inducir la delección de Cx43 en la glía envolvente, se estudió la inmunomarcación contra Cx43 en el bulbo olfatorio de ratones de los grupos experimentales mencionados (Figura R2.1.B, C-F, C'-F'). Para estudiar una posible susceptibilidad diferencial a la delección de Cx43 de las subláminas de la capa de las fibras olfatorias, se evaluó la densidad de *clusters* de Cx43 desde el borde interno hacia el borde

externo de dicha capa (ver detalle del análisis en materiales y métodos, sección 9.1). Dado que no fue evidente un gradiente de expresión dependiendo de esta distancia (Figura R2.1.G), se promediaron los datos para reducir un factor en el análisis.

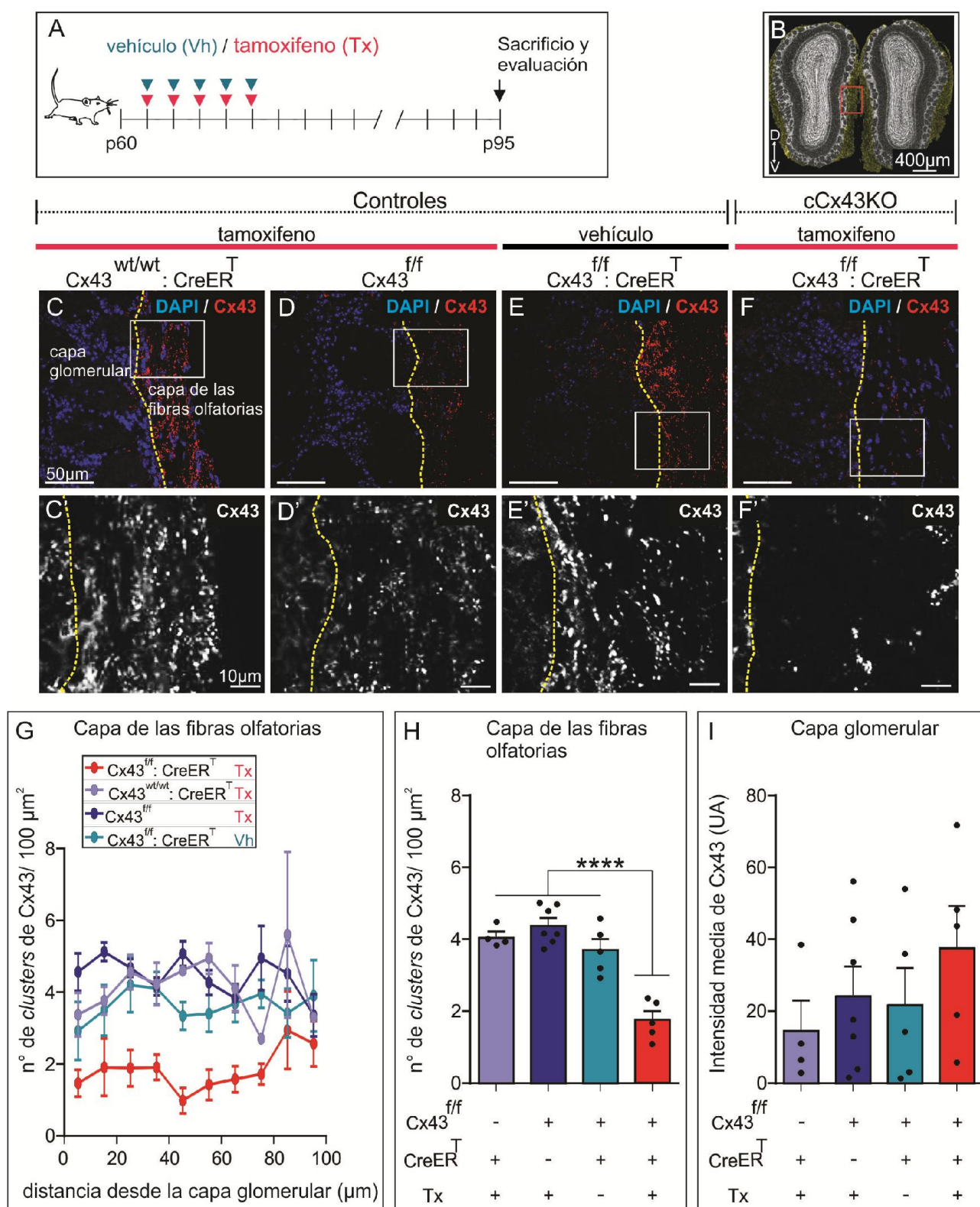


Figura R2.1. Expresión de Cx43 en el bulbo olfatorio de ratones cCx43KO. (A) Diseño experimental (ver detalle en materiales y métodos). Los animales fueron tratados con 1 dosis diaria de tamoxifeno o su vehículo durante 5 días, a partir del día postnatal 60 (p60) y evaluados en p95. (B) Corte coronal de bulbo olfatorio mostrando la capa de las fibras olfatorias (esquematizada en amarillo). El recuadro indica la zona donde se capturaron las imágenes. (C-F) Inmunofluorescencia contra Cx43 (rojo) en el bulbo olfatorio de los ratones portadores de los transgenes de interés, tratados con tamoxifeno o vehículo, según se indica. La marca nuclear se muestra en azul y la línea punteada indica la interfase entre la capa glomerular y la capa de las fibras olfatorias. (C'-F') Aumento de las imágenes recuadradas en C-F; se muestra la marcación contra Cx43. (G) Densidad de *clusters* de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias en función de la distancia desde el límite externo de la capa glomerular. (H) Densidad promedio de *clusters* de Cx43 en la capa de fibras olfatorias. (I) Intensidad promedio de la inmunomarcación contra Cx43 en la capa glomerular. Se muestra la media \pm EE. (H) ANOVA de una vía: $p < 0.0001$, con prueba posterior de Bonferroni: **** $p < 0.0001$. (I) ANOVA de una vía: $p > 0.05$.

En consistencia con lo esperado, los animales tratados con tamoxifeno que portan la doble modificación genética (cCx43KO) mostraron una reducción del 60% en la densidad de *clusters* inmunoreactivos para Cx43 en la capa de las fibras olfatorias, respecto del grupo de controles (Figura R2.1.H). La densidad de *clusters* de Cx43 no difirió entre los grupos controles, confirmando que la reducción de Cx43 observada se debe a las modificaciones genéticas y que es inducible por tamoxifeno. Por otro lado, la intensidad de la expresión de Cx43 en la capa glomerular no difirió entre los grupos experimentales (Figura R2.1.I). Este resultado muestra que el sistema es selectivo para el blanco glial esperado, ya que el tipo principal de glía presente en la capa glomerular lo constituyen los astrocitos, que no se espera que expresen la recombinasa Cre en este sistema, ya que no expresan PLP.

2.2 La Cx30 no compensa la reducción en la expresión de Cx43 observada en la capa de las fibras olfatorias de los ratones cCx43KO

Como mencionamos en el capítulo anterior, la reducción de Cx43 en la glía envolvente olfatoria podría llevar al aumento compensatorio de Cx30. Por lo tanto, evaluamos la inmunoreactividad para Cx30 en el bulbo olfatorio de animales de los cuatro grupos experimentales (Figura R2.2. A-D, A'-D'). La densidad de *clusters* en la capa de las fibras olfatorias y la intensidad de inmunomarcación de Cx30 en la capa glomerular no fueron diferentes entre los distintos grupos experimentales (Figura R2.2. E-G). Por lo tanto, la reducción de Cx43 en los animales cCx43KO, no es compensada por la expresión de Cx30.

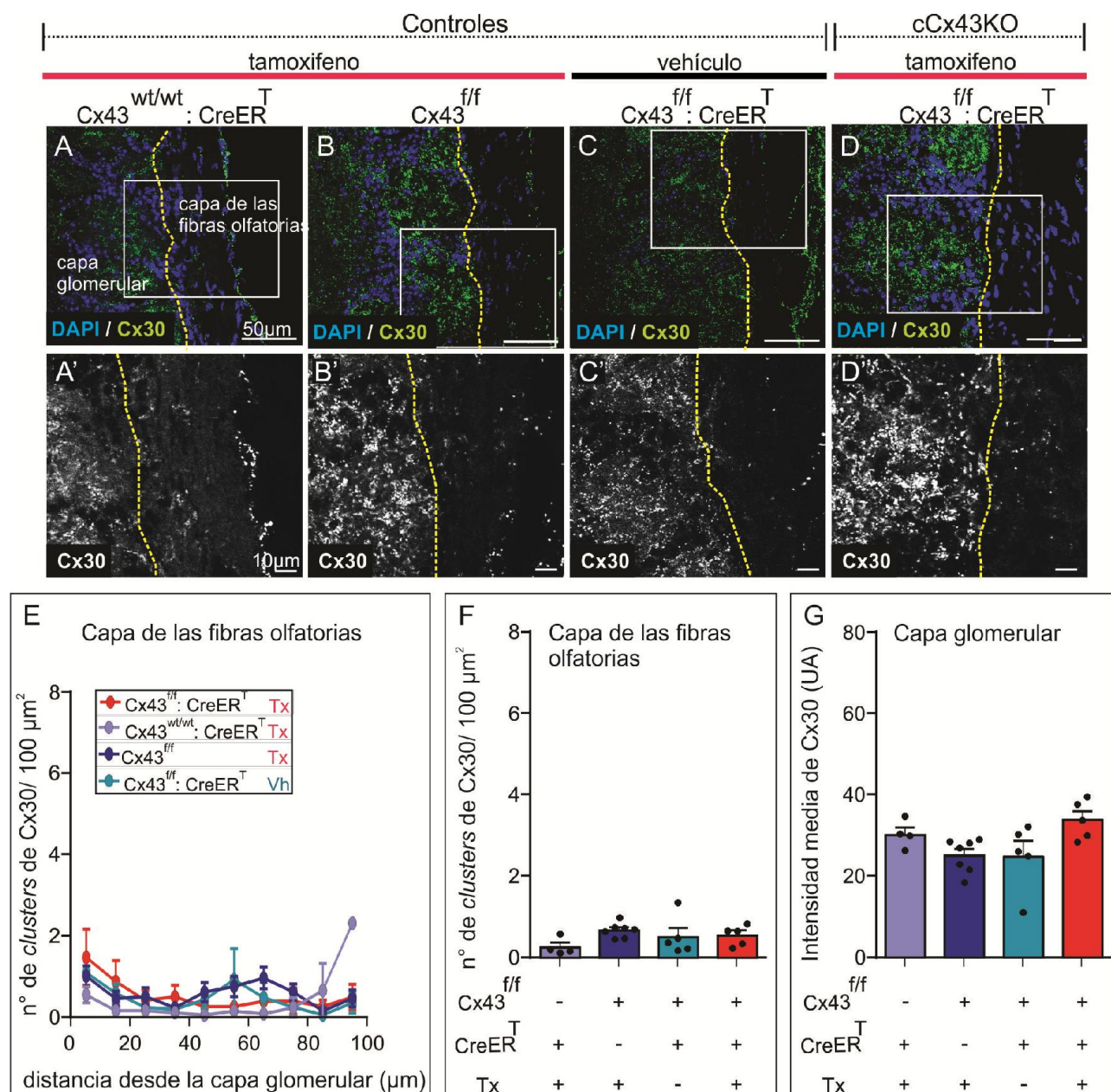


Figura R2.2. Expresión de Cx30 en el bulbo olfatorio de ratones cCx43KO. (A-D) Inmunofluorescencia contra Cx30 (rojo) en el bulbo olfatorio de los ratones portadores de los transgenes de interés, 35 días después del tratamiento con tamoxifeno o vehículo, según se indica. La marca nuclear se muestra en azul y la línea punteada indica la interfase entre la capa glomerular y la capa de las fibras olfactorias. (A'-D') Aumento de las imágenes recuadradas en A-D; se muestra la inmunomarca contra Cx30. (E) Densidad de *clusters* de Cx30 en la capa de las fibras olfactorias en función de la distancia desde el límite externo de la capa glomerular. (F) Densidad de *clusters* de Cx30 en la capa de fibras olfactorias. (G) Intensidad promedio de la inmunomarcación contra Cx30 en la capa glomerular. Se muestra la media \pm EE. (F y G) ANOVA de una vía: $p > 0.05$.

Dado que en los experimentos mostrados no observamos diferencias entre los diferentes grupos control, para los análisis siguientes se utilizó como grupo control a los animales portadores de una única modificación genética, tratados con tamoxifeno.

2.3 La delección de Cx43 no se asocia con una pérdida de las células de la glía envolvente

Las conexinas participan en la homeostasis celular, permitiendo el intercambio de iones, de pequeñas moléculas y de segundos mensajeros, por lo cual la delección de Cx43 en la glía envolvente de los ratones cCx43KO podría afectar la supervivencia de esta glía. Para descartar esta posibilidad, se cuantificó la densidad de células de la glía envolvente en la capa de las fibras olfatorias de ratones cCx43KO y ratones control. Para lograr la identificación celular usamos la inmunoreactividad contra BLBP (marcador de la glía envolvente) (Figura R2.3.A y B).

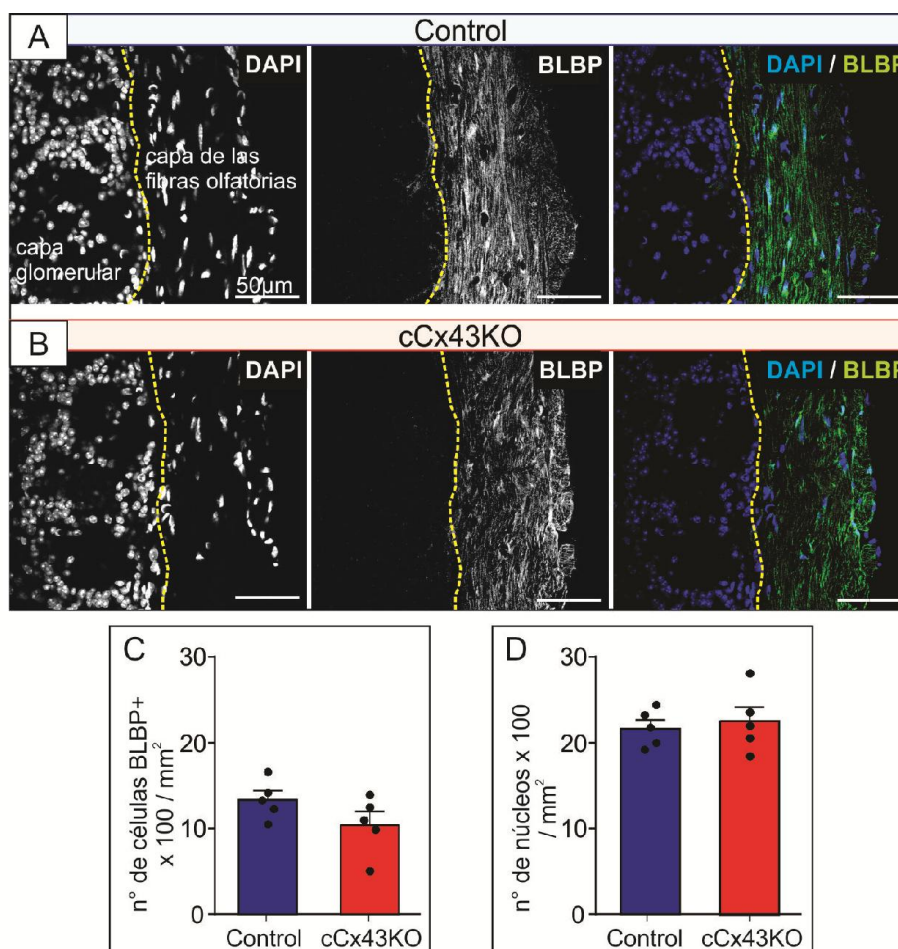


Figura R2.3. Densidad de células inmunoreactivas para BLBP en la capa de las fibras olfatorias del bulbo de ratones cCx43KO. Inmunofluorescencia contra BLBP (verde), en ratones cCx43KO (A) y control (B). La marca nuclear se muestra en azul y la línea punteada separa la capa glomerular de la capa de las fibras olfatorias. (C) Densidad de células positivas para BLBP en la capa de las fibras olfatorias. (D) Densidad de núcleos en la capa de las fibras olfatorias. Se muestra la media \pm EE. (C y D) Prueba no paramétrica (Mann-Whitney): $p > 0.05$.

El análisis de la densidad de células positivas para BLBP en la capa de las fibras olfatorias no mostró diferencias entre los grupos experimentales (Figura R2.3.C). Tampoco la densidad total de núcleos de esta capa difirió entre los ratones cCx43KO y los controles (Figura R2.3.D), sugiriendo que la homeostasis de la población de glía envolvente no es afectada por la delección de Cx43.

2.4 La delección de Cx43 en la glía envolvente se asocia con una reducción en la corriente de membrana

Previamente se reportó que las células de la glía envolvente en las que se evidencia el acople a otras en experimentos de *dye-coupling*, manifiestan un perfil biofísico con grandes amplitudes de corriente de membrana, y alta sensibilidad al MFA, inhibidor farmacológico de conexinas. El MFA reduce la amplitud de la corriente de membrana, resultando en un perfil electrofisiológico característico de células espontáneamente desacopladas en experimentos de *dye-coupling*. (Rela et al., 2010, 2015).

Para estudiar si la delección de Cx43 en la glía envolvente de los ratones cCx43KO reproduce el fenotipo biofísico de la glía envolvente desacoplada, se caracterizó sus perfiles de corriente en ratones cCx43KO y control mediante registros electrofisiológicos en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp* (Figura R2.4.A).

La amplitud de la corriente de membrana evocada por pulsos de voltaje en un rango amplio del potencial de membrana (-160 a +120 mV) se redujo en las células de la glía envolvente de los ratones cCx43KO, respecto del grupo control (Figura R2.4.B). Consistentemente, se observó un aumento de la resistencia de entrada en las células de la glía envolvente de los ratones cCx43KO, respecto del grupo control (Figura R2.4.C). Por otra parte, el potencial de membrana de reposo de las células de la glía envolvente no mostró diferencias entre los grupos experimentales (Figura R2.4.D), como es de esperar para la desaparición de canales intercelulares o hemicanales no selectivos.

Estos resultados muestran que las células de la glía envolvente de los ratones cCx43KO manifiestan un perfil biofísico de propiedades de membrana que reproduce lo observado en los registros de glía envolvente desacoplada (ya sea de forma espontánea o luego del desacople inducido por la incubación con MFA) (Rela et al., 2010, 2015).

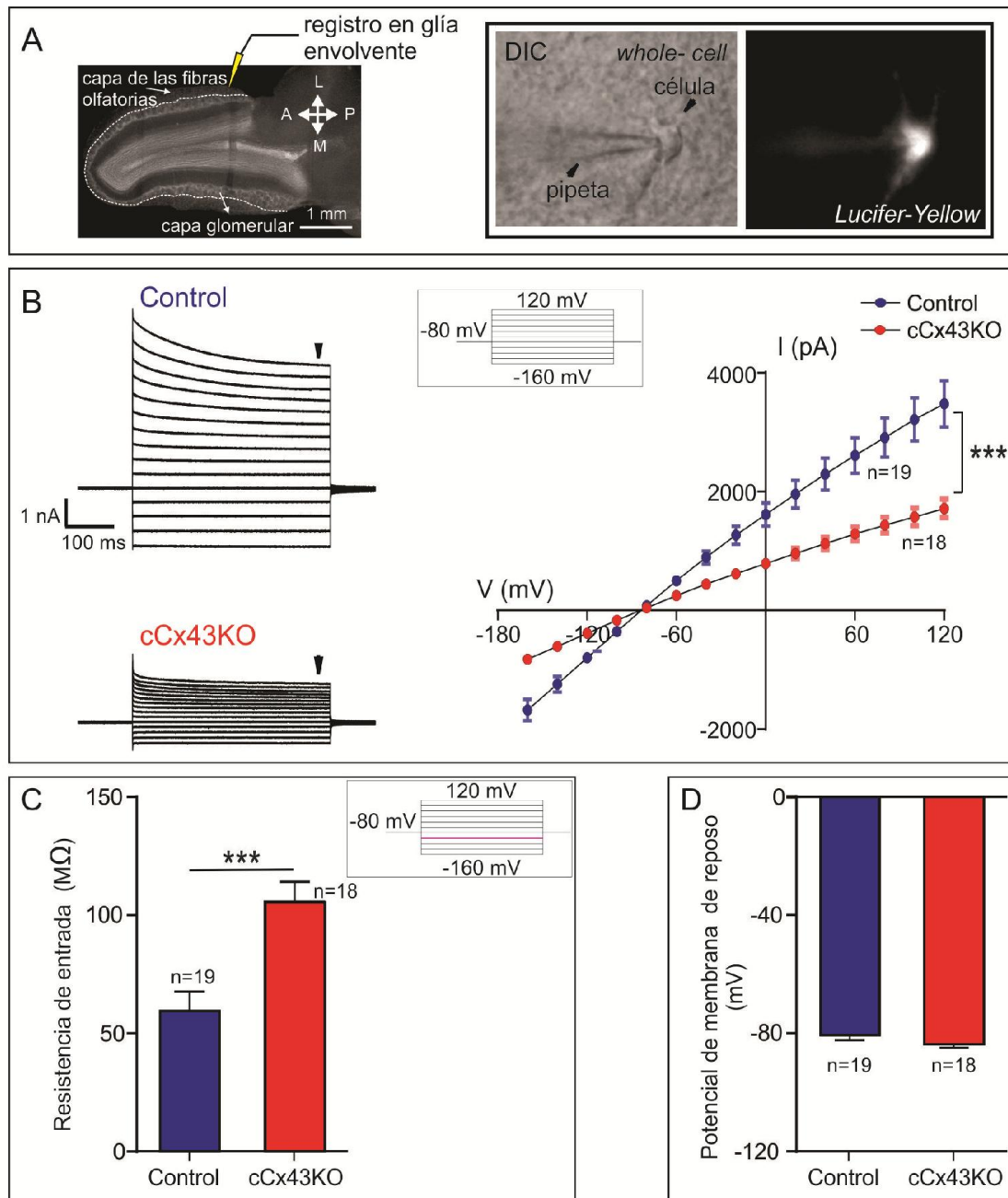


Figura R2.4. Propiedades biofísicas de membrana de la glía envoltante de ratones cCx43KO. (A) Izquierda: rodaja aguda de bulbo olfatorio de un ratón fijada y teñida con DAPI para marcación nuclear, ilustrando la localización de registro. Derecha: Ejemplo de una imagen capturada en DIC de una célula de la glía envoltante registrada, cargada con Lucifer-Yellow, colorante presente en la pipeta de registro. (B) Registros representativos de la corriente total de membrana evocada en células de la glía envoltante, evocada por los pulsos de voltaje indicados en el recuadro (fijación de voltaje en configuración *whole cell*) para los ratones control y cCx43KO. A la derecha de los registros se observan las curvas promedio de corriente versus voltaje (I/V). (C) Resistencia de entrada de las células de la glía envoltante de ratones control y cCx43KO, calculada a partir de la corriente evocada por el pulso hiperpolarizante de -20 mV. (D) Potencial de membrana de reposo de las células de la glía envoltante de ratones control y cCx43KO, calculado a partir de una rampa de pulsos de voltaje. Se muestra la media \pm EE. (B) ANOVA de dos vías (factores: delección y voltaje) con medida repetida para el voltaje: interacción *** $p < 0.001$, efecto de la delección: $p < 0.001$, efecto del voltaje: $p < 0.001$. (C) Prueba paramétrica para muestras no pareadas (t-test): *** $p < 0.001$. (D) Prueba paramétrica para muestras no pareadas (t-test): $p > 0.05$.

2.5 Reducción de la sensibilidad al MFA en las células de la glía envolvente de ratones cCx43KO

Si la corriente de membrana sensible a MFA en la glía envolvente está dada por Cx43, esperamos que dicha sensibilidad se reduzca en la glía de animales cCx43KO. Para evaluar esto, medimos la amplitud de la corriente evocada en las células de la glía envolvente antes y después del agregado de este bloqueante, en rodajas agudas de bulbo olfatorio de ratones control y cCx43KO (Figura R2.5.A y B).

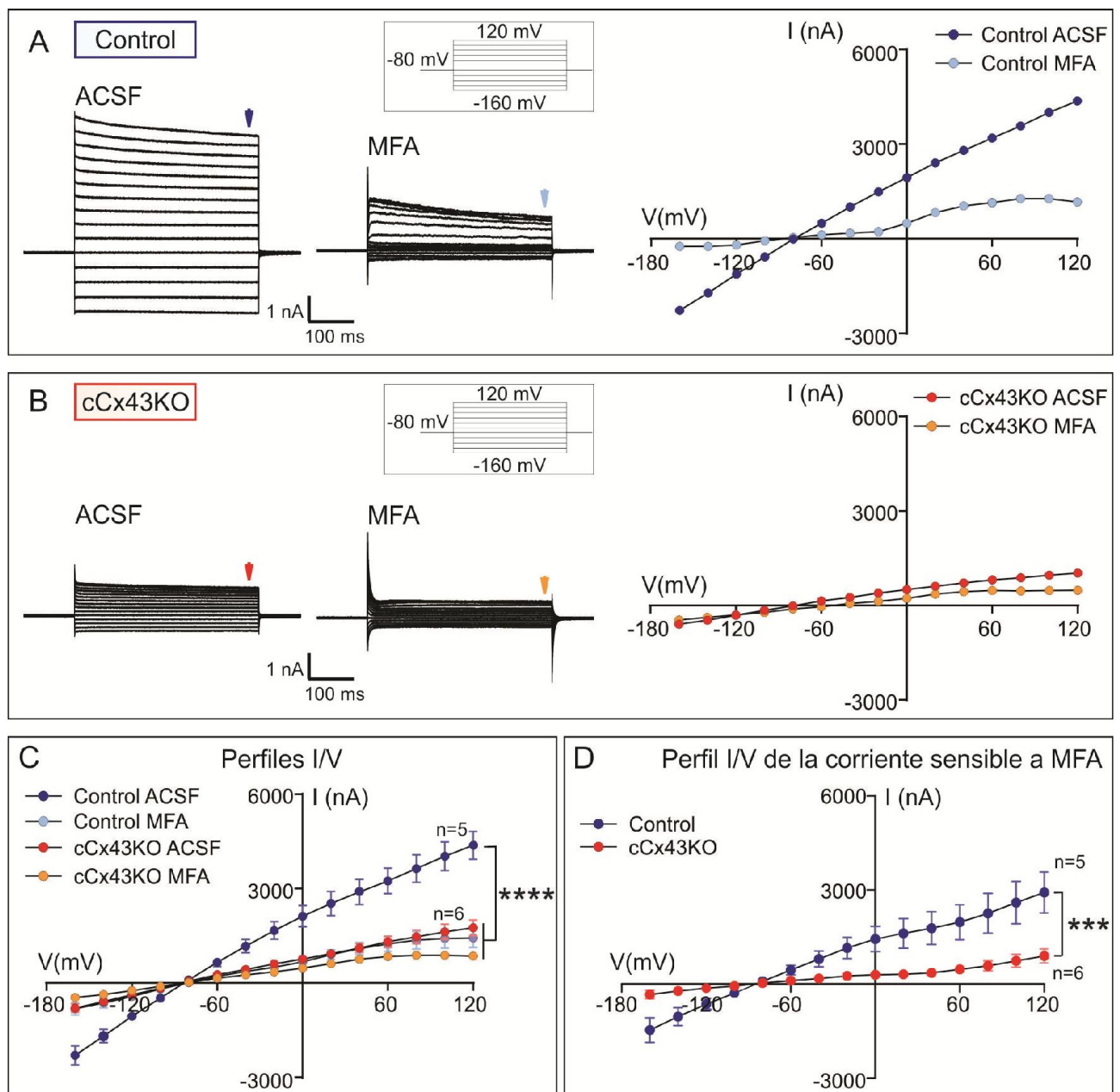


Figura R2.5. Sensibilidad de la corriente de membrana al ácido meclofenámico en la glía envolvente de ratones cCx43KO. Registros representativos de la corriente de membrana evocada por los pulsos de voltaje indicados en el recuadro (fijación de voltaje en configuración *whole cell*), antes y después del agregado de 100 μ M de MFA, en células de la glía envolvente de ratones control **(A)** y cCx43KO **(B)**. A la derecha de los registros se observan las curvas de corriente versus voltaje (I/V) correspondientes. **(C)** Curvas promedio de corriente versus voltaje, para los registros de células de la glía envolvente antes y después de la perfusión con MFA para ambos grupos experimentales. **(D)** Curvas promedio de corriente versus voltaje para la corriente de membrana sensible a MFA de las células de la glía envolvente de ambos grupos experimentales. Se muestra la media \pm EE. (C) ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción **** $p < 0.0001$, efecto de la delección: $p < 0.01$, efecto del voltaje: $p < 0.0001$. (D) ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción *** $p < 0.001$, efecto de la delección: $p < 0.05$, efecto del voltaje: $p < 0.001$.

La incubación con MFA redujo efectivamente la corriente de membrana evocada, en el rango amplio de pulsos voltaje estudiado, en las células de la glía envolvente de animales control, consistente con lo reportado (Rela et al., 2010, 2015). En contraste, el efecto del MFA sobre la amplitud de la corriente de membrana es mínimo en las células de la glía envolvente de ratones cCx43KO (Figura R2.5.C). De acuerdo con estos resultados, los ratones cCx43KO presentan una corriente sensible al MFA de amplitud muy reducida, en comparación con la observada en las células de los ratones control (Figura R2.5.D). Estos resultados indican que los ratones cCx43KO carecen del blanco de acción del MFA en la glía envolvente.

Los resultados presentados en esta sección validan la efectividad y selectividad del modelo Cx43^{flox/flox};PLP-CreER^T para inducir la delección de Cx43 en la glía envolvente con control temporal, y demuestran que la Cx43 es el mediador principal de la corriente sensible a MFA en las células de la glía envolvente, sugiriendo que la Cx43 media el acople por *gap junctions* en esta glía.

Resultados: Parte 3

La delección de conexina 43 en la glía envolvente se asocia con la reducción del *input* sensorial al bulbo y déficits en la percepción de olores

La expresión de conexinas es esencial para funciones modulatorias sobre la función neuronal, ya sea por su papel en el establecimiento de redes mediadas por *gap junctions*, como por sus funciones como molécula de adhesión y su participación en cascadas de señalización intracelular (Dai et al., 2007). Es posible que la Cx43 de la glía envolvente, soporte funciones tales como el mantenimiento de la homeostasis extracelular, la provisión de metabolitos energéticos y la liberación concertada de neurotrofinas, con potencial impacto en la permisividad del nervio olfatorio para el crecimiento axonal y, por ende, la incorporación funcional de las neuronas sensoriales nuevas al circuito olfatorio. Para evaluar si la Cx43, expresada por la glía envolvente, condiciona el mantenimiento funcional de la vía aferente olfatoria, utilizamos el modelo de delección selectiva de Cx43 en la glía envolvente, presentado en la sección anterior, y analizamos indicadores de la incorporación de neuronas sensoriales nuevas y de la funcionalidad del circuito.

3.1 Reducción del *input* sensorial al bulbo en los ratones cCx43KO

Un parámetro informativo del mantenimiento funcional de la vía aferente olfatoria es la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en interneuronas periglomerulares del bulbo olfatorio. El nivel de TH es sensible al *input* sensorial, el cual se encuentra reducido en condiciones de privación sensorial olfativa y ante la degeneración de las neuronas sensoriales (ver introducción Figura I.5.B). Se evaluó el porcentaje de células inmunoreactivas para TH en la capa glomerular del bulbo olfatorio de ratones cCx43KO y control (Figura R3.1.A y B).

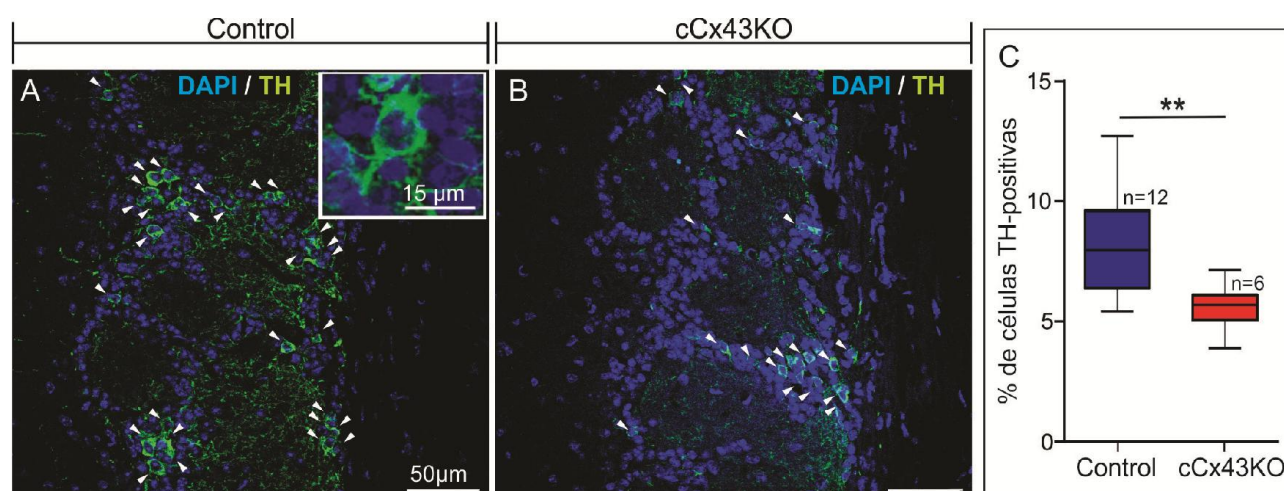


Figura R3.1. Expresión de TH en el bulbo olfatorio de ratones cCx43KO. Inmunofluorescencia contra TH (verde) en el bulbo olfatorio de ratones control (A) y cCx43KO (B). La marca nuclear se muestra en azul, las flechas indican las células TH+ y el recuadro muestra en detalle una célula TH+ (C) Porcentaje de células TH+ en el bulbo olfatorio de ratones control y cCx43KO. Se muestra la mediana ± el rango intercuartil. Prueba no paramétrica (Mann-Whitney): **p<0.01.

Los animales cCx43KO, mostraron una reducción en el porcentaje de células TH+ respecto al grupo control (Figura R3.1.C), sugiriendo un *input* sensorial deficiente al bulbo.

3.2 La delección de Cx43 en la glía envolvente interfiere con la detección de los olores

Para estudiar si la reducción de las interneuronas TH+ observada en los ratones cCx43KO, se encuentra asociada a deficiencias en la función olfativa, evaluamos el desempeño conductual de los ratones cCx43KO y control en un ensayo olfativo de habituación-deshabitación a estímulos olfativos. Con el objetivo de observar el curso temporal de la aparición de un posible fenotipo conductual, repetimos el ensayo a distintos tiempos (15, 30, 45 y 60 días) después del comienzo de la inducción de la delección por tratamiento de tamoxifeno. Para evidenciar el grado de activación de elementos del circuito olfatorio en respuesta a estímulos olfativos, pasados 15 días de la última evaluación conductual en el ensayo de habituación-deshabitación, los animales experimentaron una sesión de exposición a estimulación olfativa y una hora después fueron sacrificados para evaluar la expresión de c-fos, que se asocia con aumento de la actividad neuronal (ver introducción, Figura I.5.C), en las interneuronas del bulbo (Figura R3.2).

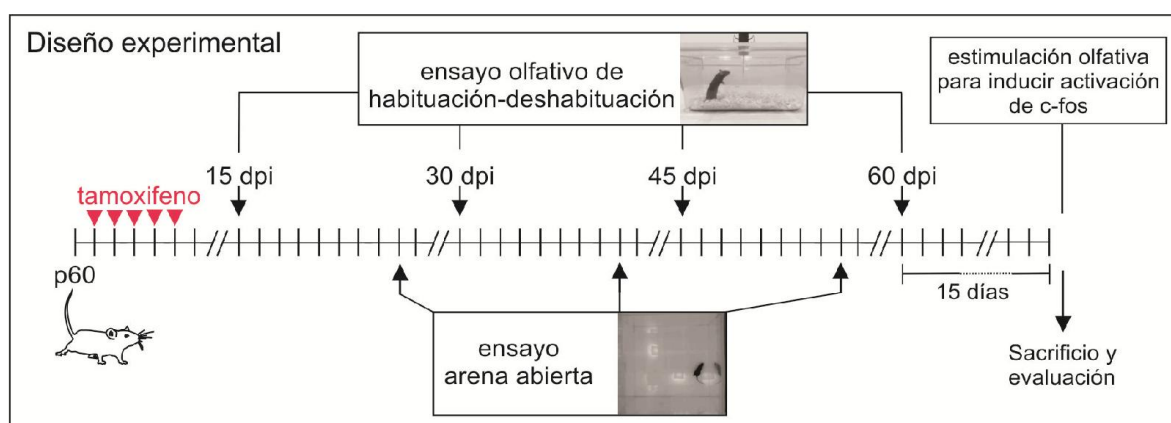


Figura R3.2. Diseño para la evaluación de la función olfativa. Los ratones macho adultos cCx43KO y control se evaluaron en un ensayo olfativo de habituación-deshabitación, a los 15, 30, 45 y 60 días posteriores a la primera inyección de tamoxifeno (dpi). Una semana después de cada ensayo de habituación-deshabitación, con excepción del último, se estudió la conducta locomotora de los ratones en un ensayo de arena abierta (*open field*). Para evaluar la activación de c-fos en las interneuronas periglomerulares y granulares del bulbo, 15 días después de la última evaluación en el ensayo de habituación-deshabitación, los ratones se sometieron a un protocolo de estimulación olfativa para inducción de c-fos y se sacrificaron para su evaluación por inmunohistoquímica.

El ensayo olfativo de habituación-deshabitación presentado en esta sección se realizó como fue descrito en la sección Resultados: Parte 1 de esta tesis.

A los 45 días luego del tratamiento con tamoxifeno los ratones cCx43KO mostraron una reducción, respecto del grupo control, en el tiempo de *sniffing* para la primera presentación del olor artificial coco y de ambos olores sociales, mismo sexo y sexo opuesto, mientras que a los demás tiempos analizados los ratones cCx43KO fueron indistinguibles de los controles (Figura R3.3.A-D). Estos resultados sugieren un déficit transitorio en la función olfativa del grupo cCx43KO. A la luz de los resultados presentados en Resultados: Parte 1, el comportamiento de los animales cCx43KO se asemeja al de animales con hiposmia inducida por metimazol. Los resultados presentados aquí vuelven a poner en evidencia que los estímulos olfativos de olor a coco y olor social correspondiente al sexo opuesto, emergen como los más sensibles para detectar diferencias conductuales entre animales normósmicos e hipósmicos.

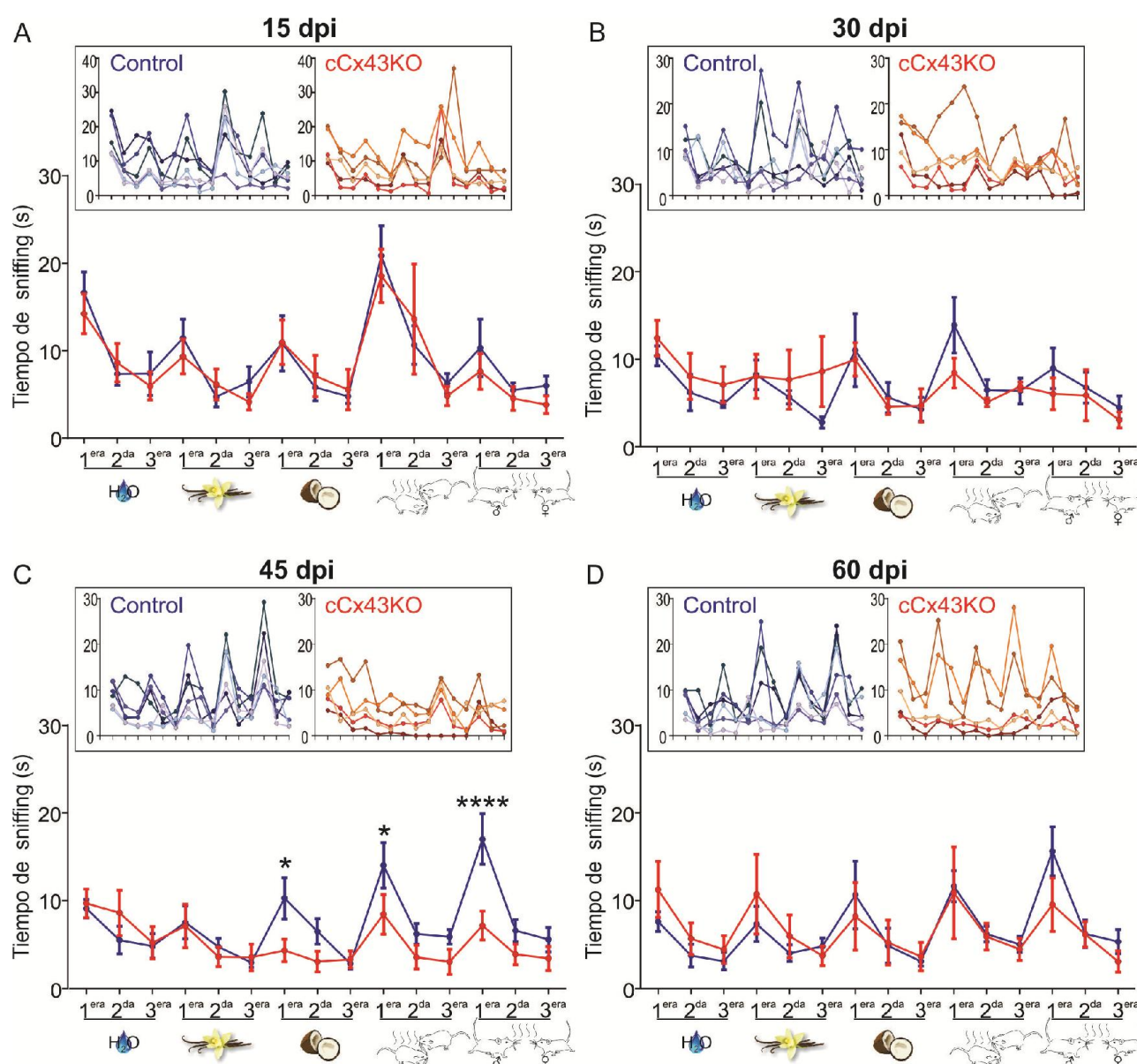


Figura R3.3. Desempeño en el ensayo olfativo de habituación-deshabitación de ratones cCx43KO. Se muestra la cuantificación del tiempo total de *sniffing* para cada presentación de los estímulos a los 15 (A), 30 (B), 45 (C) y 60 (D) días después de la primera dosis de tamoxifeno (dpi).

Los datos se muestran como la media \pm EE. Los recuadros muestran los valores individuales; se asignó un código de color a cada ratón. ANOVA de dos vías (factores: deleción y estímulo) con medida repetida para el estímulo, con prueba posterior de la diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher. (A, B y D) interacción: $p > 0.05$, efecto del estímulo: $p < 0.0001$, efecto de la deleción: $p > 0.05$; (C) interacción: $p < 0.001$, efecto del estímulo: $p < 0.0001$, efecto de la deleción: $p > 0.05$, comparación *post-hoc*: * $p < 0.05$ y **** $p < 0.0001$.

Para reducir factores en el análisis y poder comparar los datos conductuales a diferentes tiempos post-deleción de Cx43, estimamos la capacidad de distinguir entre la última presentación de un estímulo y la primera presentación del estímulo siguiente en el ensayo de habituación-deshabitación, mediante un índice reportado en Rodrigues et al., 2014 (Figura R3.4.A). El índice fue calculado para los olores artificiales y sociales combinados respectivamente, a todos los tiempos posteriores a la primera dosis de tamoxifeno evaluados (Figura R3.4.A).

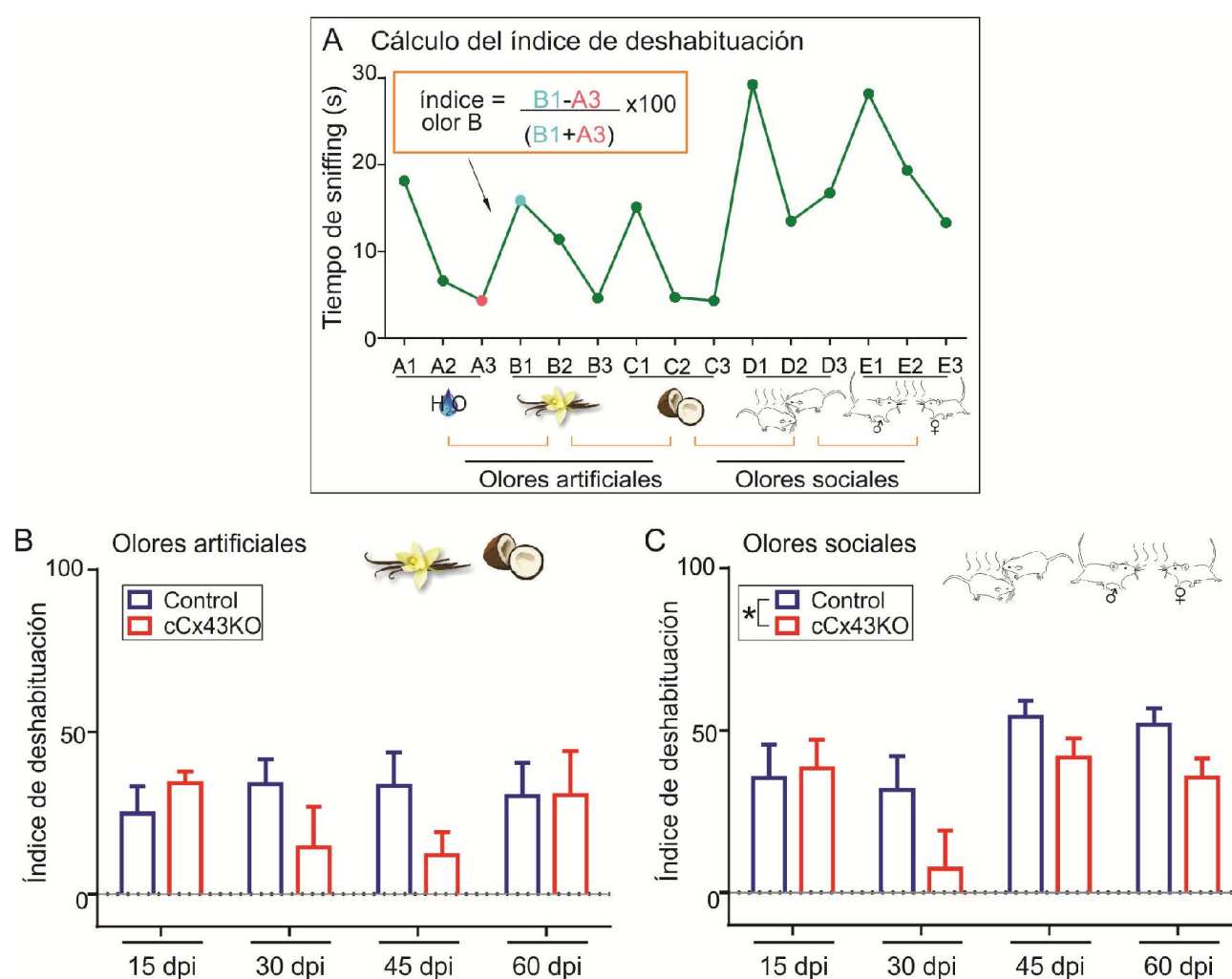


Figura R3.4. Índice de deshabitación para los olores artificiales y sociales presentados en el ensayo olfativo de habituación-deshabitación. (A) Cálculo del índice de deshabitación: se calculó la diferencia en el tiempo de *sniffing* entre la primera presentación de un estímulo y la última presentación del estímulo anterior a este, y se relativizó a la suma de ambos tiempos. Para todos los tiempos evaluados, se promediaron los índices de deshabitación de los ratones control y cCx43KO, agrupando los olores artificiales (B) y los olores sociales (C). Los datos se muestran como la media \pm EE. ANOVA de dos vías (factores: tiempo y deleción). (B) interacción: $p > 0.05$, efecto del tiempo: $p > 0.05$, efecto de la deleción: $p > 0.05$. (C) Interacción: $p > 0.05$, efecto del tiempo: $p < 0.01$, efecto de la deleción: * $p < 0.05$.

La comparación de los índices de deshabitación de los olores artificiales no detectó diferencias entre grupos ni a lo largo del tiempo, si bien se observa una tendencia a la reducción en los ratones cCx43KO a los 30 y 45 días posteriores al tratamiento con tamoxifeno para inducir la delección de Cx43 (Figura R3.4.B). Por otra parte, el análisis de los índices de deshabitación para los olores sociales detectó diferencias entre los grupos experimentales y a lo largo del tiempo, pero la interacción no fue significativa. Sin embargo, las diferencias tienden a manifestarse principalmente a los 30 días post-tratamiento con tamoxifeno, reforzando la idea de que la delección de Cx43 produce déficits de la función olfativa que emergen a los 30 días y revierten, al menos parcialmente, a los 60 días.

Para descartar que las diferencias observadas en el ensayo de habituación-deshabitación se deban a una deficiencia en la actividad locomotora y/o a una componente de ansiedad diferencial, se realizó un ensayo conductual de exploración de una arena abierta. Para minimizar la interferencia entre ensayos, este se efectuó una semana después de cada ensayo de habituación-deshabitación, con excepción del último.

La distancia total recorrida y la velocidad máxima alcanzada en el ensayo de arena abierta no mostraron diferencias entre los grupos ni a lo largo del tiempo, indicando la ausencia de un déficit motor robusto en los ratones cCx43KO (Figura R3.5.A-C). Por otra parte, el tiempo de permanencia y el porcentaje de la distancia total recorrida en el área del centro de la arena fue mayor en los ratones cCx43KO que en el grupo control (Figura R3.5D y E, respectivamente), sugiriendo que los ratones cCx43KO experimentan un estado de tipo levemente ansiolítico. Aunque los resultados indican que los animales cCx43KO presentan una leve disminución en conductas relacionadas con ansiedad, que se manifiesta como incremento de exploración de la zona central desprotegida del campo abierto, interpretamos que su respuesta deficiente frente a diferentes odorantes refleja una alteración sensorial que no estaría relacionada con los niveles de exploración o ansiedad. Una tendencia mayor a explorar estímulos nuevos potencialmente ansiogénicos va en contra del comportamiento observado en la prueba de habituación-deshabitación.

En resumen, si bien el número de animales debe incrementarse, los datos presentados, correspondientes a dos experimentos independientes, sugieren que la delección de Cx43 en la glía envolvente se asocia de forma transiente con una pérdida en la función olfativa.

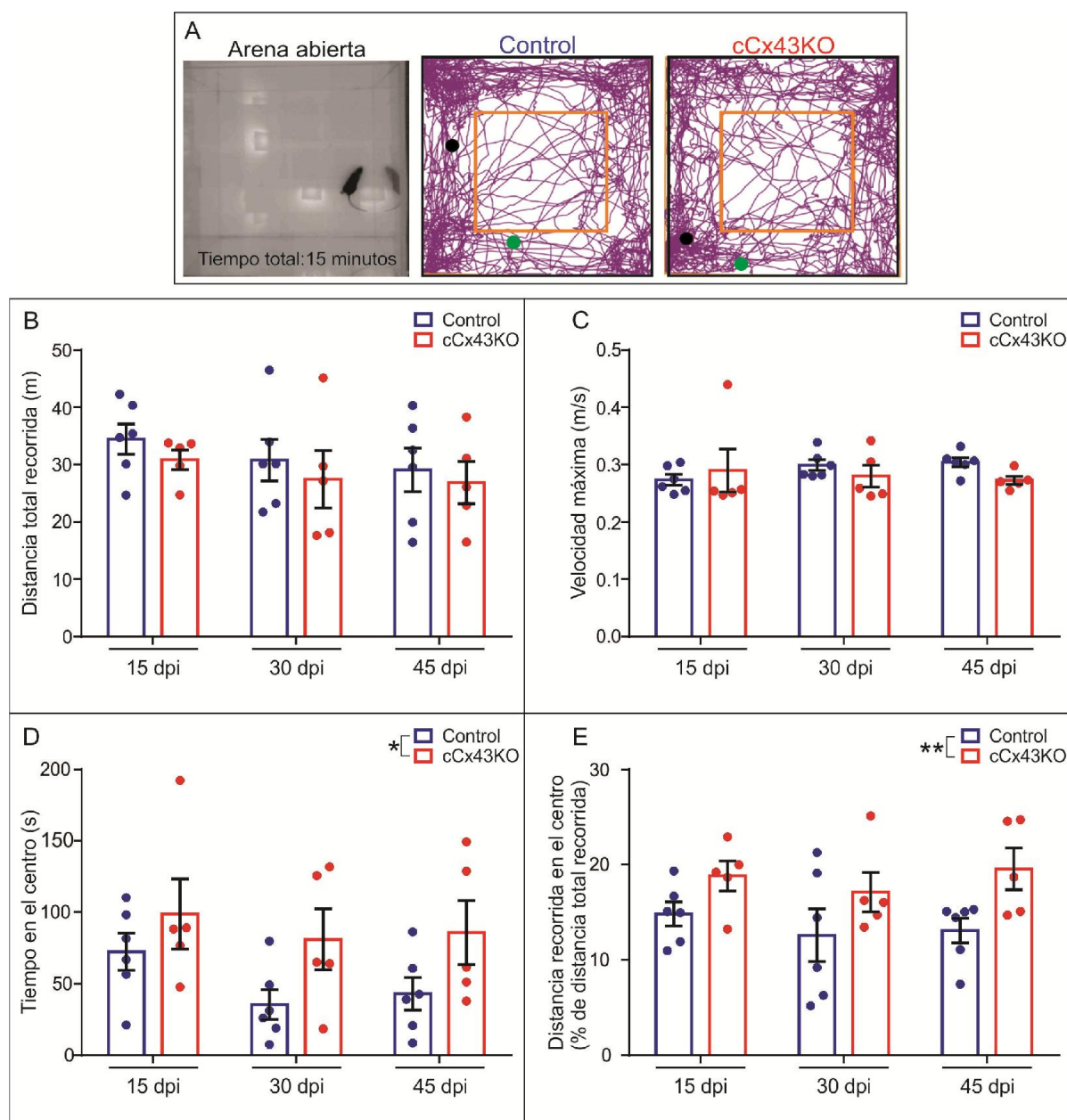


Figura R3.5. Evaluación de la conducta locomotora de ratones cCx43KO en el ensayo de arena abierta (open field). (A) Trayectoria representativa en la arena abierta de un ratón control y uno cCx43KO. Los puntos, verde y rojo, indican la ubicación del ratón al inicio y al final del ensayo, respectivamente. (B) Cuantificación de la distancia total recorrida, (C) la velocidad máxima adquirida, (D) el tiempo recorrido en la región central de la arena y (E) el porcentaje de la distancia recorrida en el centro. Los datos se muestran como la media \pm EE. ANOVA de dos vías (factores: tiempo y delección). (B y C) interacción: $p > 0.05$, efecto del tiempo: $p > 0.05$, efecto de la delección: $p > 0.05$. (D) interacción: $p > 0.05$, efecto del tiempo: $p > 0.05$, efecto de la delección: $*p < 0.05$. (E) Interacción: $p > 0.05$, efecto del tiempo: $p > 0.05$, efecto de la delección: $**p < 0.01$.

3.3 **Reducción de la inducción de c-fos en interneuronas periglomerulares del bulbo de los ratones cCx43KO**

Para evaluar si los déficits en la función olfativa en ratones cCx43KO se asocian con activación anormal de neuronas del circuito olfatorio en respuesta a un estímulo olfativo, se estudió la inmunomarcación contra c-fos en el bulbo olfatorio de ratones control y cCx43KO luego de ser expuestos a estimulación olfativa. Para realizar este experimento se utilizaron los ratones que previamente evaluamos conductualmente. Dos semanas después del ensayo de habituación-deshabitación correspondiente a los 60 días post-tratamiento con tamoxifeno, los animales se sometieron a un protocolo de estimulación olfativa con el olor artificial coco (Figura R3.6.A). Se eligió este olor, por presentar sensibilidad a los déficits de la función olfativa observados en los ratones cCx43KO y previamente en los animales tratados con MMZ.

El porcentaje de células positivas para c-fos se cuantificó en la región ventro-medial de la capa glomerular y granular de secciones de bulbo olfatorio (Figura R3.6.B) marcadas mediante inmunohistoquímica. En la capa glomerular del bulbo de los ratones cCx43KO se observó una reducción en el porcentaje de interneuronas periglomerulares c-fos+, respecto del grupo control, mientras que en la capa granular no se observaron diferencias entre los grupos (Figura R3.6.C y D). Este resultado indica que en los ratones cCx43KO el reclutamiento de las interneuronas periglomerulares del circuito en respuesta al estímulo fue deficiente. Es esperable que un pobre reclutamiento glomerular se refleje en una actividad reducida de elementos de las capas más profundas del circuito, sin embargo esto no fue observado. Dado que los animales fueron evaluados para c-fos en un momento en el cual el fenotipo conductual parece haber revertido, la actividad del circuito podría involucrar fenómenos compensatorios. Resta evaluar la expresión de c-fos en tiempos previos para definir este aspecto.

En ausencia de exposición a la estimulación olfativa, el porcentaje de células c-fos+ observado fue bajo tanto para los ratones control como para los cCx43KO, indicando que la expresión de c-fos es inducida por la estimulación con coco (Figura R3.6.C, ver línea punteada sobre las barras). El porcentaje basal de células c-fos+ obtenido se encuentra dentro del rango de valores basales de expresión de c-fos reportado en la bibliografía.

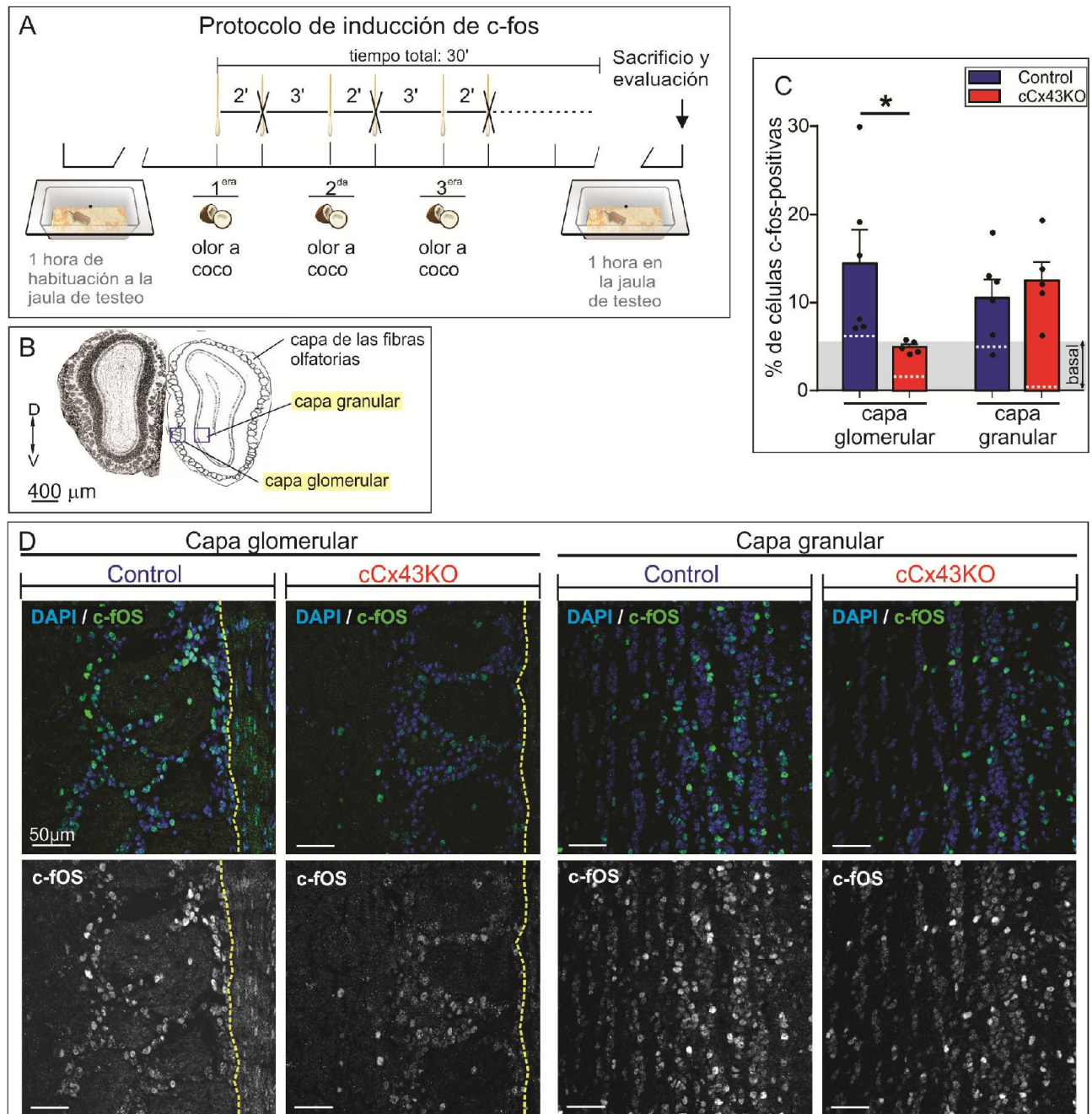


Figura R3.6. Expresión de c-fos en interneuronas periglomerulares y granulares del bulbo olfatorio de ratones cCx43KO en respuesta a la estimulación olfativa. (A) Protocolo de inducción de c-fos. Los animales se habituaron 1 hora en la jaula de testeo. Se presentó el estímulo 6 veces durante 2' a intervalos de 3 minutos para minimizar la adaptación. Luego los animales permanecieron por 1 hora en la jaula de testeo y se sacrificaron para su evaluación. (B) Sección coronal y esquema del bulbo indicando la capa de fibras olfatorias, glomerular y granular. (C) Porcentaje de células inmunoreactivas para c-fos en la capa glomerular y granular del bulbo olfatorio de ratones control y cCx43KO sometidos a estimulación olfativa. La línea punteada sobre las barras indica el valor de c-fos en un ratón control y uno cCx43KO sin exposición al protocolo de inducción. La sombra en gris, refiere el rango del nivel basal de c-fos reportado en la bibliografía (Bautze et al., 2014; Kang et al., 2009; Keller et al., 2006). (D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra c-fos (verde) en la capa glomerular (izquierda) y granular (derecha) de ratones control y cCx43KO expuestos al protocolo de estimulación olfativa. La marca nuclear se muestra en azul y la línea punteada indica la interfase entre la capa glomerular y la capa de las fibras olfatorias. Se muestran también individualmente la marca c-fos. Los datos se muestran como la media \pm EE. ANOVA de dos vías (factores: zona y delección), con prueba posterior de Bonferroni. Interacción: $p < 0.05$, efecto de la zona: $p > 0.05$, efecto de la delección: $p > 0.05$, prueba *post-hoc*: * $p < 0.05$.

3.4 **Reducción de la migración baso-apical de las neuronas sensoriales nuevas en el epitelio olfatorio de ratones cCx43KO**

La maduración de las neuronas sensoriales olfatorias se encuentra asociada a su migración en dirección baso-apical en el epitelio olfatorio, permitiendo la determinación del estadio de maduración por su posición en el epitelio y por la expresión de marcadores estadio-específicos (Caggiano et al., 1994). Para estudiar si la delección de Cx43 en la glía envolvente interfiere con la migración baso-apical asociada a la maduración de las neuronas sensoriales nuevas del epitelio olfatorio, marcamos una cohorte de neuronas nuevas mediante el tratamiento con BrdU de ratones control y cCx43KO (Figura R3.7.A). Revelamos la marcación con BrdU por inmunohistoquímica y evaluamos su ubicación en el epitelio y la colocalización con el marcador de neuronas sensoriales inmaduras GAP-43 a dos tiempos luego del marcaje de la cohorte. El tratamiento con BrdU se realizó 40 días después del tratamiento con tamoxifeno para inducir la delección de Cx43, tiempo al que observamos un déficit de la función olfativa en los ratones cCx43KO.

Inicialmente evaluamos dos tiempos que se encontraban descriptos como adecuados para estudiar la migración de las neuronas nuevas en ratones juveniles: 4 y 8 días post-marcaje con BrdU (Matarazzo et al., 2004). Sin embargo, para ambos tiempos la marca de BrdU permaneció localizada en la base del epitelio olfatorio y no resultaron informativos para evaluar la migración de las células BrdU+ en el epitelio de ratones en la edad adulta usada en esta tesis (Figura R3.7.B). Por lo tanto, se eligieron tiempos más tardíos: 7 y 11 días post-marcaje con BrdU, y se cuantificó la ubicación del núcleo de las células BrdU+, respecto a la lámina propia, en secciones de epitelio olfatorio de ratones control y cCx43KO. Se informó para cada célula BrdU+, la existencia o no de colocalización con el marcador GAP-43. Los resultados mostraron que a los 7 días post-marcaje con BrdU, la posición baso-apical del soma de las células BrdU+ no difirió entre los grupos, mientras que a 11 días del marcaje, las células BrdU+ de los ratones control desplazaron su soma en dirección apical una distancia significativamente mayor que las de los ratones cCx43KO (Figura R3.7.C-E). Luego de 11 días del tratamiento con BrdU, alrededor del 70% de las células BrdU+ fueron negativas para GAP-43, tanto en los ratones control como cCx43KO. Aunque resta evaluarlo, esperamos que esta población sea heterogénea, con las células basales en estadios madurativos previos a la expresión de GAP-43 y las más apicales con expresión de OMP. Esta población estaría enriquecida en las primeras en los ratones cCx43KO, y en las OMP+ en los controles.

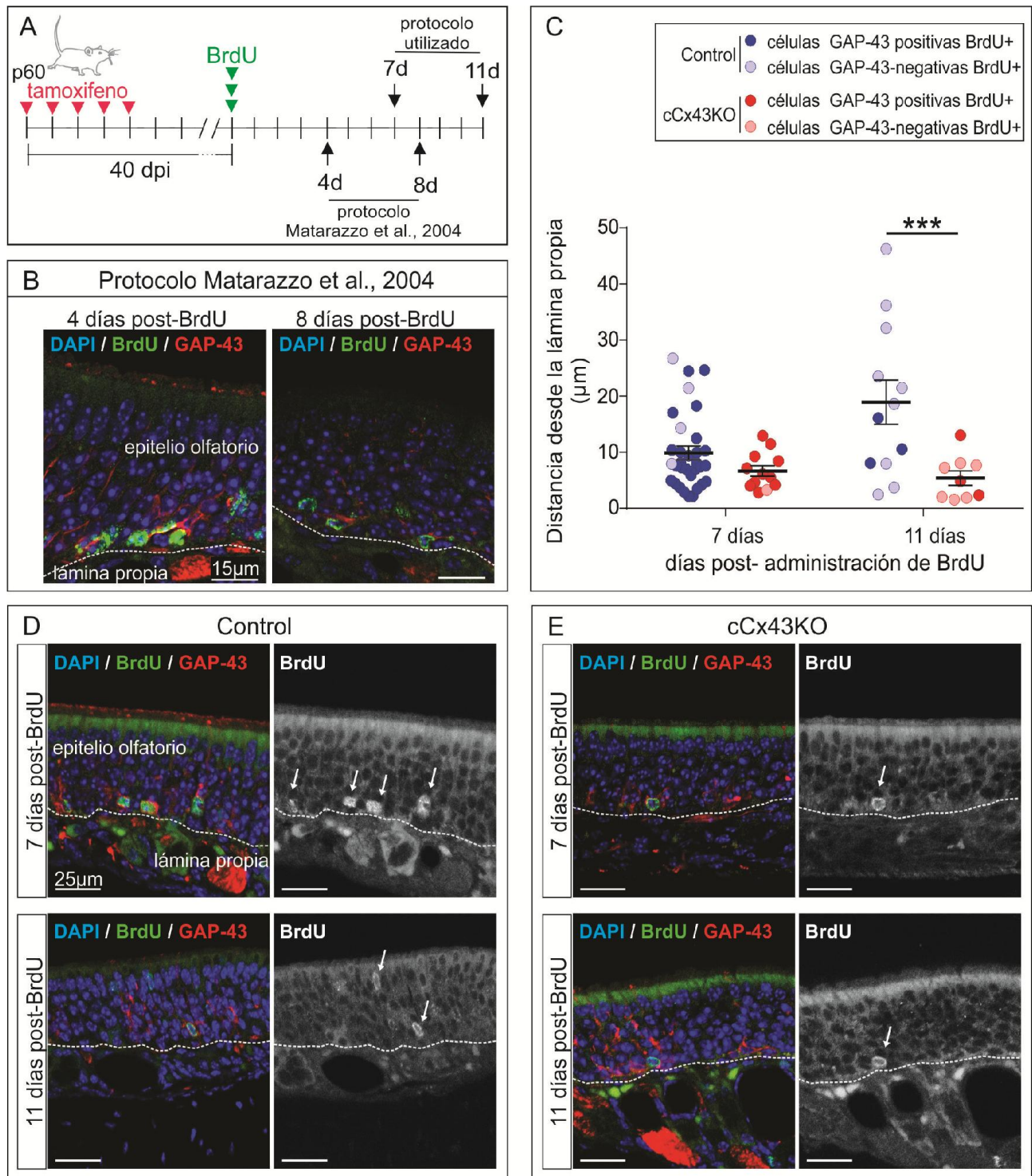


Figura R3.7. Migración de neuronas sensoriales nuevas en el epitelio olfatorio de ratones cCx43KO. (A) Protocolo experimental para el marcaje de neuronas nuevas mediante tratamiento con BrdU. (B) Imágenes representativas del epitelio olfatorio mostrando células marcadas por BrdU a los 4 (izquierda) y 8 (derecha) días de su tratamiento, para ratones control. (C) Posición baso-apical de neuronas inmaduras nuevas a los 7 y 11 días luego del marcaje con BrdU, para animales controles y cCx43KO. Se indica para cada célula la colocalización o no con el marcador GAP-43 según leyenda. (D y E) Imágenes representativas del epitelio olfatorio inmunomarcado para BrdU y GAP43 a los 7 y 11 días luego del marcaje con BrdU, para animales control y cCx43KO. (C) Los datos se muestran como la media \pm EE. ANOVA de dos vías (factores: tiempo post-BrdU y delección), con prueba posterior de Bonferroni. Interacción: $p < 0.05$, efecto del tiempo post-BrdU: $p > 0.05$, efecto de la delección: $p < 0.001$, comparación *post-hoc*: *** $p < 0.001$. $n = 5$, para cada grupo.

Estos resultados indican que la migración de las neuronas sensoriales nuevas se encuentra demorada en el entorno deficiente en Cx43 en la glía envolvente de ratones cCx43KO, lo cual podría estar asociado al déficit funcional observado.

3.5 **La delección de Cx43 no afecta el número total de neuronas inmaduras y maduras del epitelio olfatorio**

El déficit madurativo de las neuronas nuevas observado en los ratones cCx43KO, podría originar una reducción o desbalance en la composición neuronal del epitelio olfatorio. Para estudiar esta posibilidad, evaluamos el espesor del epitelio, su densidad de núcleos y su composición en cuanto a la densidad de células inmaduras (GAP-43+) y maduras (OMP+). Para realizar este experimento se utilizaron secciones de epitelio olfatorio de ratones control y cCx43KO, 45 días después del tratamiento con tamoxifeno, tiempo al que se observó un déficit de la función olfativa. Según la topografía espacial de las proyecciones de los axones de las neuronas sensoriales del epitelio en el bulbo olfatorio (ver introducción, Figura I.4), se analizó el turbinal III y la zona del septum enfrentada a este, ya que la zona del bulbo donde se evaluó la disminución de c-fos en los ratones cCx43KO después de la estimulación olfativa, refiere aproximadamente a estas regiones del epitelio (Figura R3.8.A).

El espesor del epitelio olfatorio y la densidad de núcleos que lo componen no difirió entre los grupos control y cCx43KO (Figura R3.8 B y C). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos respecto a la densidad de neuronas GAP-43+ y neuronas OMP+ tanto en la región del septum (Figura R3.8.D y E), como en el turbinal III (Figura R3.8.F), indicando que el déficit en la maduración neuronal no se asocia con alteraciones robustas de la composición neuronal del epitelio en la ventana de tiempo evaluada.

Estos resultados muestran que la delección de Cx43 en la glía envolvente se asocia con una reducción del *input* sensorial al bulbo, la disminución de la activación de las interneuronas periglomerulares en respuesta a un estímulo olfativo y un déficit transiente de la función olfativa, sugiriendo que la Cx43 expresada por la glía envolvente participa en el mantenimiento funcional del circuito. Además, si bien la proporción de neuronas sensoriales maduras e inmaduras no difirió entre los grupos control y cCx43KO, la reducción en la migración de las neuronas sensoriales nuevas observada en los ratones cCx43KO, sugiere que el entorno deficiente en Cx43 en la glía envolvente, afecta la tasa de maduración de las neuronas sensoriales olfatorias.

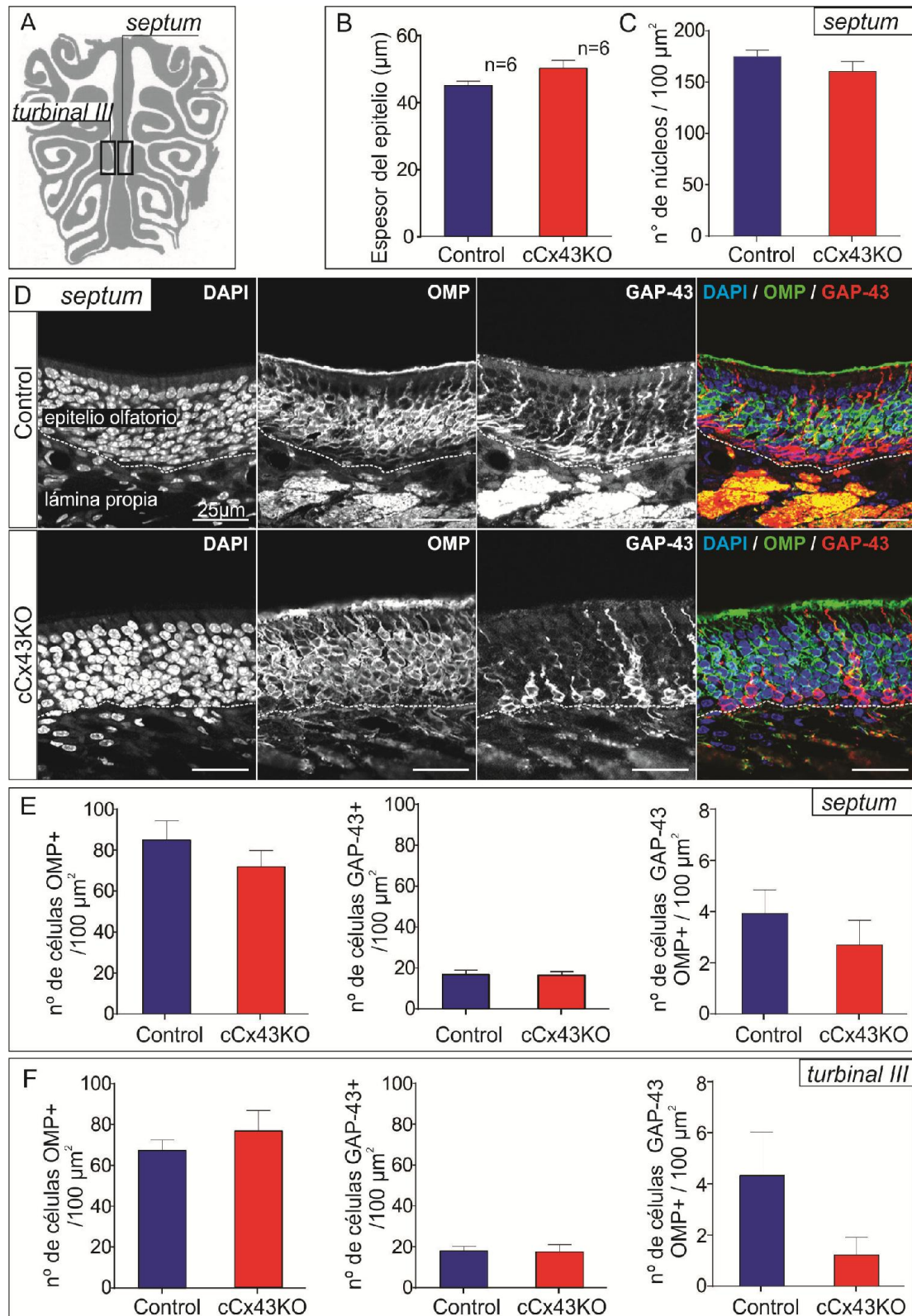


Figura R3.8. Composición neuronal del epitelio olfatorio de ratones cCx43KO. (A) Esquema de sección coronal del epitelio olfatorio; se indican las regiones estudiadas del septum y el turbinas III. (B) Espesor del epitelio en la región del septum de ratones control y cCx43KO. (C) Densidad de núcleos en la región del septum de ratones control y cCx43KO. (D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra GAP-43 (rojo) y OMP (verde) en la región del septum del epitelio olfatorio de ratones control y cCx43KO. La marca nuclear se observa en azul (DAPI). Se muestran los canales individuales para cada marcador. (E) Cuantificación de las neuronas GAP-43+ y OMP+ en la región del septum de ratones control y cCx43KO. (F) Cuantificación de las neuronas GAP-43+ y OMP+ en la región del turbinas III de ratones control y cCx43KO. Los datos se muestran como la media \pm EE. Prueba no paramétrica (Mann-Whitney): $p > 0.05$.

Discusión y Conclusiones

Plasticidad de la glía envolvente durante la degeneración/regeneración del nervio olfatorio

Aunque se propone que la glía envolvente sostiene el mantenimiento de la vía aferente olfatoria, la capacidad de regeneración del nervio olfatorio, luego del daño, fue principalmente estudiada con atención en la remodelación neuronal. En esta tesis reproducimos el modelo de daño reversible inducido por la olfatotoxina metimazol y en el contexto de daño/regeneración del nervio, estudiamos la remodelación de la glía envolvente asociada, incluyendo indicadores biofísicos indirectos de las redes de glía envolvente.

En consistencia con lo reportado para los atrociitos en modelos de isquemia o de inflamación (Chanson et al., 2005; Karpuk et al., 2011), durante la degeneración/regeneración del epitelio olfatorio inducida por metimazol, observamos alteraciones en la expresión de conexinas gliales en el bulbo olfatorio, sugiriendo la sensibilidad de las redes gliales al daño. La expresión de Cx43 fue modulada diferencialmente en las capas del bulbo luego del daño al epitelio olfatorio inducido por metimazol: se observó una reducción de su expresión en la capa de las fibras olfatorias y, en contraste, un aumento en la capa glomerular. Estos resultados sugieren que la glía glomerular (probablemente astrociitos) responde al daño de forma diferencial a la glía envolvente de la capa de las fibras olfatorias, lo cual puede estar asociado a propiedades diferenciales de cada tipo de glía o señales diferenciales correspondientes a cada capa del bulbo (señales provenientes de los terminales sinápticos en la capa glomerular, versus liberación extra-sináptica de neurotransmisores en la capa de las fibras olfatorias (Lohr et al., 2011)).

Por otra parte se observó la regulación positiva de la expresión de Cx30, típicamente expresada por los astrociitos, únicamente en la capa glomerular del bulbo y durante la fase temprana del proceso de degeneración/regeneración inducido por metimazol (5 días post-tratamiento con metimazol). Este resultado es consistente con la reducida expresión de Cx30 en condición control reportada para la capa de las fibras olfatorias (Roux et al., 2011), dónde la principal conexina expresada es la Cx43 (Rela et al., 2010), y sugiere que en contraste a lo observado para la Cx43, la modulación de la expresión de Cx30 esta asociada posiblemente a eventos tempranos de la degeneración de las neuronas sensoriales (como modificaciones en su actividad (Koulakoff et al., 2008)), ya que no se sostiene en tiempos posteriores.

En astrociitos previamente se reportó la modulación negativa de la expresión de conexinas asociada a los contextos de inflamación y su regulación positiva en contextos de isquemia (Karpuk et al., 2011; Nakase et al., 2006). En el modelo de daño al nervio olfatorio inducido por metimazol, se reportó que la degeneración de las neuronas sensoriales se asocia con el incremento de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 (Xie et al., 2013) y está mediada por apoptosis (Sakamoto et al.,

2007). Entonces, los efectos en la modulación de conexinas que describimos en esta tesis, podrían estar asociados a procesos semejantes a los observados durante la isquemia o la inflamación, de manera diferencial según el tipo de glía. Mientras la respuesta de la glía envolvente asemeja un fenotipo inflamatorio, la respuesta astrocítica asemeja un fenotipo isquémico (Nakase et al., 2006). Sin embargo, si la modulación de las conexinas gliales tiene un efecto beneficioso neuroprotector o si facilitan el daño neuronal, es motivo de controversia (Chanson et al., 2005).

En la sección de Resultados: Parte 2 de esta tesis, mostramos que una reducción de un 60% de la expresión de Cx43 debido a su delección en la glía de la capa de las fibras olfatorias del bulbo, elimina aproximadamente el 50% de la corriente de membrana de las células de la glía envolvente. De acuerdo con esto, es esperable que la reducción en la expresión de Cx43 en la capa de las fibras olfatorias del bulbo, observada en los animales lesionados con metimazol (38% en promedio), se asocie con una reducción en la corriente de membrana de estas células. En contraste, observamos que luego del tratamiento con metimazol las células de la glía envolvente presentan una corriente de membrana emergente activable por despolarización. Una posible explicación para este resultado radica en que a diferencia de los animales lesionados con metimazol, en los ratones cCx43KO se produjo la delección de Cx43 de forma masiva en las células de la glía envolvente que sufrieron recombinación. Una explicación alternativa y no excluyente, puede basarse en una compensación de la reducción de Cx43 por la modulación positiva de la actividad de hemicanales o de la conductancia de las *gap junctions* constituidas por la Cx43 remanente en las células de la glía envolvente, luego del tratamiento con metimazol.

La semejanza en el porcentaje de inhibición de la corriente de membrana por el bloqueante farmacológico de conexinas MFA en la glía envolvente de ratones control y tratados con metimazol, sugiere que la corriente emergente observada en la glía envolvente durante la degeneración/regeneración del epitelio olfatorio inducida por metimazol, no refiere a una corriente mediada por conexinas. De las conductancias que contribuyen a la corriente total de membrana de la glía envolvente reportadas (Rela et al., 2015), la corriente emergente es compatible con la modulación positiva de canales K_{DR} . La expresión de los canales K_{DR} es regulada positivamente en astrocitos que incorporan marcadores de proliferación (Bordey et al., 2001) y fue relacionada con la progresión de la fase G1/S del ciclo celular de estos (MacFarlane and Sontheimer, 2000). Aunque resta la identificación farmacológica de los canales K_{DR} como sustrato molecular de la corriente saliente aumentada, el aumento de K_{DR} es consistente con el aumento en la densidad de células de la glía envolvente que observamos en la capa de las fibras olfatorias del bulbo de ratones tratados con metimazol. Asimismo el aumento de la densidad de células de la glía envolvente luego del tratamiento con metimazol es consistente con un estudio previo que muestra

la proliferación de la glía envolvente tras la inducción de la degeneración de las neuronas sensoriales por bulbectomía (Chehrehasa et al., 2012).

De forma adicional al incremento en la densidad de células de glía envolvente (positivas para S100B) en la capa de las fibras olfatorias debido a la lesión, se observó un aumento de la densidad de células negativas para S100B en esta capa. Como se mencionó, este resultado es compatible con datos aún no publicados de nuestro grupo que muestran la proliferación de células de la microglía en la capa de las fibras olfatorias durante la degeneración/regeneración inducida por metimazol y con resultados reportados que indican que luego del tratamiento con el herbicida diclobenil de efecto olfatotóxico, se observa el aumento de microglía en la capa de las fibras olfatorias (Denizet et al., 2016). El incremento en la densidad de las células de la glía envolvente y de la microglía luego del daño al nervio olfatorio, se ha vinculado con la fagocitosis de los restos celulares de las neuronas sensoriales en degeneración (Denizet et al., 2016; Su et al., 2013), sugiriendo la participación de la glía envolvente, al igual que la microglía, en la reparación del nervio olfatorio.

Los resultados aquí presentados amplían la caracterización reportada del modelo de daño reversible inducido por metimazol y representan evidencia funcional de que la glía envolvente acompaña plásticamente la remodelación del nervio olfatorio luego del daño.

Rol de la Cx43 en la conectividad de la glía envolvente y en el mantenimiento funcional de la vía aferente olfatoria

Previamente reportamos que la Cx43 es la principal conexina presente en la capa de las fibras olfatorias y que las células de la glía envolvente se encuentran acopladas por *gap junctions* (Rela et al., 2010), sin embargo se desconoce si esta conexina media las redes de glía envolvente. En esta tesis evaluamos si la delección de Cx43 en la glía envolvente se asocia con indicadores indirectos de la desconexión glial y si la Cx43 expresada en la glía envolvente participa en el mantenimiento funcional del circuito olfatorio. Para abordar estos objetivos, utilizamos una estrategia interseccional, que aprovecha la expresión de PLP, un marcador de oligodendrocitos y de glía envolvente, para dirigir la recombinación y delección del gen de Cx43 en la glía envolvente. Los oligodendrocitos, expresan típicamente un grupo diferente de conexinas (Cx29, Cx32 y Cx47) (Nagy and Rash, 2003) y por lo tanto, se espera que la delección del gen codificante para Cx43 no impacte sobre su fisiología. Si bien se observó que los oligodendrocitos exhiben *gap junctions* constituidas por el acople heterólogo de Cx47 expresada por éstos y Cx43 expresada por los astrocitos (Nagy et al., 2003), en la capa de las fibras olfatorias del bulbo, no se reportó la presencia de oligodendrocitos (Valverde and Lopez-Mascaraque, 1991). Además, en la

capa glomerular del bulbo olfatorio la expresión de Cx43 no difirió entre los animales control y cCx43KO, indicando que la delección de Cx43 es selectiva de la glía envolvente y no ocurre en los astrocitos de la capa glomerular, que no se espera que expresen la recombinasa Cre bajo secuencias regulatorias de PLP.

En los astrocitos, la ausencia de Cx43 típicamente es compensada por la Cx30 (Rouach et al., 2008), sin embargo nuestros resultados indican que la delección de Cx43 en la glía envolvente de los ratones cCx43KO no es compensada por esta conexina, al menos al tiempo evaluado (35 días después de la primera dosis de tamoxifeno). Resta evaluar si la delección de Cx43 en la glía envolvente desencadena mecanismos compensatorios en la expresión de Cx30 a tiempos posteriores al estudiado o si es compensada por otras conexinas, aunque en condición control no fue reportada inmunoreactividad para otras conexinas gliales como la Cx32 y la Cx26 (Rela et al., 2010).

El modelo cCx43KO nos permitió ablacionar selectivamente la expresión de Cx43 en la glía envolvente con control temporal, tanto a nivel de la expresión de proteína, como a nivel funcional en relación con las propiedades biofísicas de membrana. En los ratones cCx43KO la glía envolvente presenta un perfil biofísico semejante al observado en células desacopladas (Rela et al., 2010) y sugiere que la Cx43 es el principal mediador del acople por *gap junctions* en esta glía.

La ausencia de diferencias entre ratones cCx43KO y control en la densidad de núcleos de la capa de las fibras olfatorias y la densidad de células de glía envolvente, sugiere que la ablación selectiva de Cx43 no afecta la supervivencia del blanco glial y valida la utilidad del modelo.

Aunque es necesario validar con indicadores directos el acople por *gap junctions*, como por ejemplo experimentos de *dye-coupling*, los resultados presentados constituyen la primera evidencia de que la Cx43 es el principal mediador de la conectividad de la glía envolvente.

En consistencia con la modulación negativa de la actividad sináptica reportada para la delección de Cx30 en los astrocitos glomerulares del bulbo (Pannasch et al., 2014), la delección de Cx43 en la glía envolvente utilizando el modelo de ablación selectiva presentado en esta tesis, se asocia con una reducción del *input* sensorial al bulbo, revelada por una disminución en la inmunomarcación para TH en el bulbo de los animales cCx43KO. La expresión de TH en el bulbo olfatorio depende de la liberación de glutamato por los terminales de las neuronas sensoriales olfatorias (Puche and Shipley, 1999) y la reducción de la actividad sináptica después de la deprivación sensorial por oclusión de una narina, es responsable de la regulación negativa de TH en el bulbo ipsilateral a la narina ocluida (Sawada et al., 2011). Aquí la reducción de la expresión

de TH en el bulbo olfatorio de los ratones cCx43KO, se asoció con una baja de la función olfativa medida en un ensayo de habituación-deshabitación a estímulos olfativos (Figura D.1). Nuestros resultados sugieren que el déficit de la función olfativa aparece entre los 30 y los 45 días posteriores al tratamiento con tamoxifeno para inducir la deleción de Cx43 en la glía envolvente, y revierte, al menos conductualmente, mediante mecanismos posiblemente compensatorios a los 60 días posteriores a la deleción. Inclusive en el tiempo al que observamos la reversión en el fenotipo conductual, el circuito del bulbo mostró una respuesta deficiente a la estimulación olfativa, manifestada por la expresión reducida de c-fos en las interneuronas periglomerulares del bulbo de los ratones cCx43KO (Figura D.1).

Si bien los ratones cCx43KO exhiben una conducta que podría asociarse con un estado ansiolítico en el ensayo de la arena abierta, la conducta observada en el ensayo de habituación-deshabitación es opuesta a la esperada en un estado ansiolítico y por eso descartamos que el déficit de la función olfativa, esté dirigido por un componente de ansiedad. Este resultado es compatible con el estado ansiolítico observado en ratones con deleción de Cx43 en astrocitos (Frisch et al., 2003).

De manera semejante a lo observado para los astrocitos deficientes en Cx30 en el bulbo olfatorio (Pannasch et al., 2014), el déficit en la función olfativa de los ratones cCx43KO podría estar asociado a la funcionalidad de los canales de conexina en el mantenimiento de la transmisión sináptica, como el control de la homeostasis de factores esenciales del metabolismo energético (Allaman et al., 2011), del K^+ extracelular (Wallraff et al., 2006) y del glutamato (Oliet et al., 2001). Sin embargo, siendo que la glía envolvente se asocia con los tractos axonales, además de con el neuropilo glomerular, consideramos que los canales de conexina puedan participar en la homeostasis del nervio y funcionar como moléculas de adhesión, promoviendo el crecimiento axonal y la maduración de las neuronas sensoriales (Elias et al., 2007).

Dado que la hipótesis propuesta en esta tesis sostiene que la expresión de Cx43 por la glía envolvente media la conectividad por *gap junctions* de la glía envolvente y participa en el establecimiento de un entorno permisivo para la incorporación de neuronas nuevas al circuito olfatorio, evaluamos si la deficiencia de Cx43 en la glía envolvente de los ratones cCx43KO, se asocia con una alteración del proceso de maduración de las neuronas sensoriales. En efecto, observamos que la maduración de neuronas nuevas se vio demorada en ratones con glía envolvente deficiente en Cx43, lo cual se manifestó por una reducción de la migración baso-apical de las neuronas nuevas en el epitelio olfatorio.

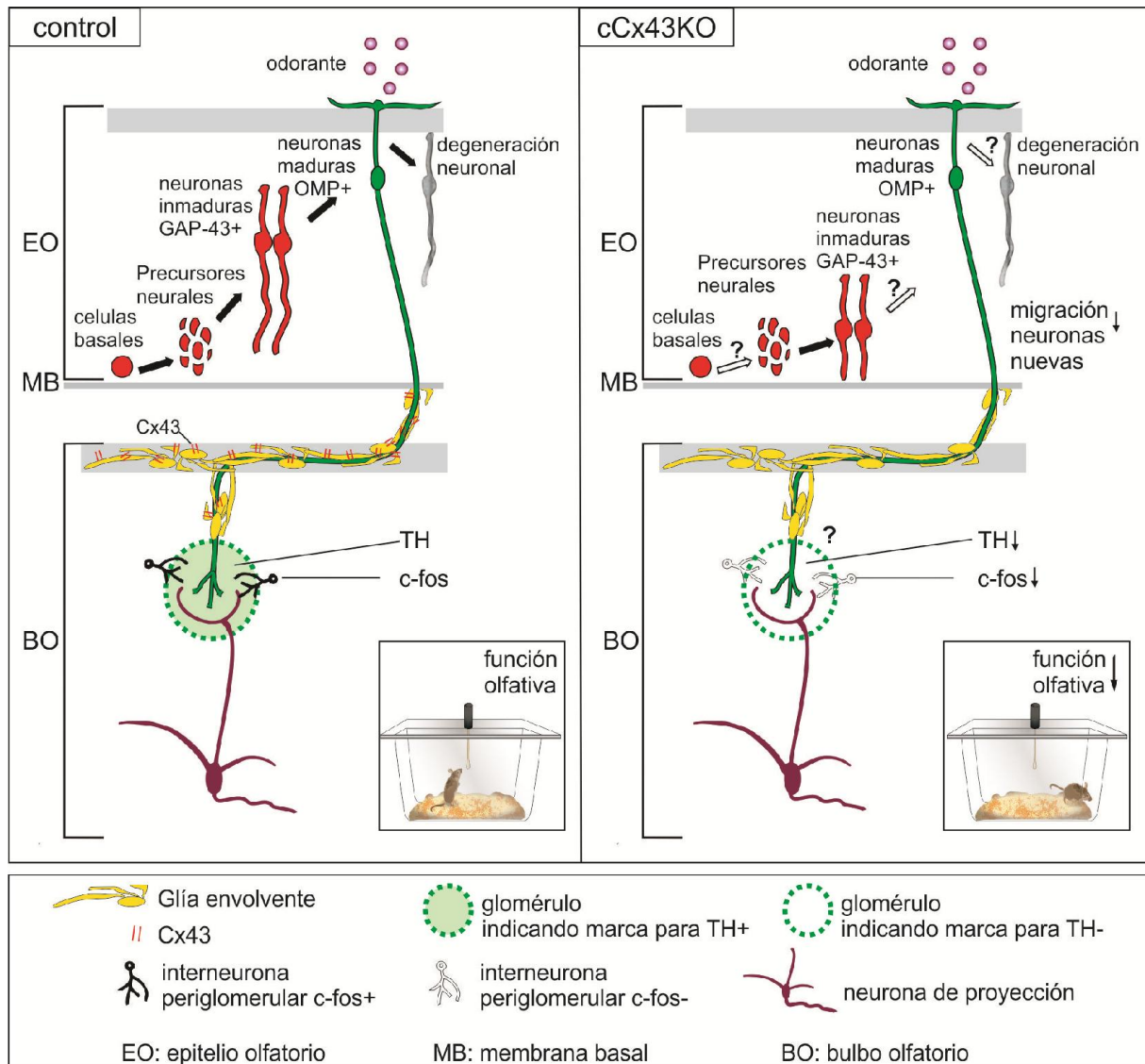


Figura D.1. La Cx43 y el mantenimiento funcional del circuito olfatorio. En los ratones **control** (panel superior, izquierda): la glía envolvente expresa Cx43; en el bulbo el *input* sensorial normal se indica con el glomérulo relleno en verde; el estímulo olfativo, odorante, se asocia con la expresión de c-fos por las interneuronas periglomerulares del bulbo y una respuesta conductual olfativa normal (recuadro); en el epitelio olfatorio se observa la migración normal de las nuevas neuronas. En los ratones **cCx43KO** (panel superior, derecha): la glía envolvente es deficiente en Cx43; en el bulbo el *input* sensorial deficiente se indica con el glomérulo vacío; el estímulo olfativo, induce deficientemente la expresión de c-fos en las interneuronas periglomerulares del bulbo, y la respuesta conductual olfativa es deficiente (recuadro); en el epitelio olfatorio la migración de las nuevas neuronas es demorada. Los signos de interrogación indican que en el epitelio olfatorio no se evaluó la tasa de proliferación celular, la tasa de generación de neuronas maduras y la tasa de degeneración neuronal. Además en el bulbo olfatorio desconocemos si la delección de Cx43 en la glía envolvente afecta el establecimiento de contactos sinápticos de las neuronas sensoriales con los glomérulos. Referencias del esquema (panel inferior).

La demora en la maduración podría traer aparejada la innervación demorada del bulbo por parte de las cohortes de neuronas generadas luego de la delección de Cx43, lo cual explicaría el *input* sensorial deficiente al bulbo. Llama la atención la ausencia de diferencias en la composición neuronal del epitelio, pero existen antecedentes de retrasos en la maduración que impactan en la composición del epitelio dependiendo del momento de observación (Matarazzo et al., 2004).

Resta evaluar tiempos posteriores a los 45 días después de la delección de Cx43 en la glía envolvente, para estudiar el impacto de la demora de un mayor número de cohortes sobre la composición del epitelio. Por otra parte, la demora en la maduración de las neuronas nuevas, puede estar relacionada con la función de las conexinas como molécula de adhesión para la migración neuronal (Elias et al., 2007). La anatomía del sistema nos lleva a pensar que la Cx43 podría servir de anclaje a los axones sensoriales en crecimiento mientras navegan el nervio olfatorio hacia el bulbo, tal que una deficiencia en Cx43 demoraría el crecimiento axonal, que es parte del proceso de maduración.

Aunque resta evaluar los mecanismos subyacentes, los resultados presentados sugieren la participación de la Cx43 en el mantenimiento funcional de la vía aferente olfatoria y la incorporación de las nuevas neuronas al circuito, apoyando nuestra hipótesis de trabajo.

Desde hace más de una década se han llevado a cabo ensayos clínicos que buscan trasplantar la glía envolvente a sitios de daño, especialmente a la médula espinal, para promover la regeneración axonal, bajo el supuesto de que promueven el crecimiento axonal en el nervio olfatorio. Los ensayos en modelos animales y en pacientes han arrojado algunos resultados prometedores, pero poco consistentes. Aproximaciones como las utilizadas en esta tesis contribuyen con la identificación de sustratos moleculares relevantes y esenciales para las propiedades neurotróficas de la glía envolvente, que puedan considerarse a la hora de definir las estrategias para garantizar que los mecanismos neurotróficos se mantengan en el sitio del trasplante y permitan lograr terapias reproducibles y de resultados robustos.

Lic. Ana Paula Piantanida

Dra. Lorena Rela

Bibliografía

- Alenius, M., and Bohm, S. (2003). Differential function of RNCAM isoforms in precise target selection of olfactory sensory neurons. *Development* 130, 917–927.
- Allaman, I., Bélanger, M., and Magistretti, P.J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 34, 76–87.
- Anderová, M., Antonova, T., Petřík, D., Neprasová, H., Chvátal, A., and Syková, E. (2004). Voltage-dependent potassium currents in hypertrophied rat astrocytes after a cortical stab wound. *Glia* 48, 311–326.
- Au, E., and Roskams, A.J. (2003). Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* 41, 224–236.
- Au, W.W., Treloar, H.B., and Greer, C.A. (2002). Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* 446, 68–80.
- Baker, H. (1990). Unilateral, neonatal olfactory deprivation alters tyrosine hydroxylase expression but not aromatic amino acid decarboxylase or GABA immunoreactivity. *Neuroscience* 36, 761–771.
- Barraud, P., Seferiadis, A.A., Tyson, L.D., Zwart, M.F., Szabo-Rogers, H.L., Ruhrberg, C., Liu, K.J., and Baker, C. V (2010). Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21040–21045.
- Barrios, A.W., Núñez, G., Sánchez Quinteiro, P., and Salazar, I. (2014). Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front. Neuroanat.* 8, 63.
- Bartolomei, J.C., and Greer, C.A. (2000). Olfactory ensheathing cells: bridging the gap in spinal cord injury. *Neurosurgery* 47, 1057–1069.
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R., and Fishell, G. (2008). The Distinct Temporal Origins of Olfactory Bulb Interneuron Subtypes. *J. Neurosci.* 28, 3966–3975.
- Bautze, V., B??r, R., Fissler, B., Trapp, M., Schmidt, D., Beifuss, U., Bufe, B., Zufall, F., Breer, H., and Strotmann, J. (2012). Mammalian-specific OR37 receptors are differentially activated by distinct odorous fatty aldehydes. *Chem. Senses* 37, 479–493.
- Bautze, V., Schwack, W., Breer, H., and Strotmann, J. (2014). Identification of a natural source for the OR37B ligand. *Chem. Senses* 39, 27–38.
- Beites, C.L., Kawauchi, S., Crocker, C.E., and Calof, A.L. (2005). Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res* 306, 309–316.
- Belforte, J.E., Zsiros, V., Sklar, E.R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Quinlan, E.M., and Nakazawa, K. (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 13, 76–83.
- Bennett, M.V.L., Contreras, J.E., Bukauskas, F.F., and Sáez, J.C. (2003). New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26, 610–617.
- Bergman, U., Ostergren, A., Gustafson, A.L., and Brittebo, B. (2002). Differential effects of olfactory toxicants on olfactory regeneration. *Arch Toxicol* 76, 104–112.
- Bergström, U., Giovanetti, A., Piras, E., and Brittebo, E.B. Methimazole-induced damage in the olfactory mucosa: effects on ultrastructure and glutathione levels. *Toxicol. Pathol.* 31, 379–387.
- Blanco-Hernández, E., Valle-Leija, P., Zomosa-Signoret, V., Drucker-Colín, R., and Vidaltamayo, R. (2012). Odor Memory Stability after Reinnervation of the Olfactory Bulb. *PLoS One* 7.

- Booker-Dwyer, T., Hirsh, S., and Zhao, H. (2008). A unique cell population in the mouse olfactory bulb displays nuclear beta-catenin signaling during development and olfactory sensory neuron regeneration. *Dev Neurobiol* 68, 859–869.
- Bordey, A., Lyons, S.A., Hablitz, J.J., and Sontheimer, H. (2001). Electrophysiological characteristics of reactive astrocytes in experimental cortical dysplasia. *J Neurophysiol* 85, 1719–1731.
- Boruch, A. V, Conners, J.J., Pipitone, M., Deadwyler, G., Storer, P.D., Devries, G.H., and Jones, K.J. (2001). Neurotrophic and migratory properties of an olfactory ensheathing cell line. *Glia* 33, 225–229.
- Brann, J.H., Ellis, D.P., Ku, B.S., Spinazzi, E.F., and Firestein, S. (2015). Injury in aged animals robustly activates quiescent olfactory neural stem cells. *Front. Neurosci.* 9, 1–13.
- Brechbühl, J., Klaey, M., and Broillet, M.-C. (2008). Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* 321, 1092–1095.
- Breer, H., Fleischer, J., and Strotmann, J. (2006). The sense of smell: Multiple olfactory subsystems. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1465–1475.
- Briñón, J.G., Martínez-Guijarro, F.J., Bravo, I.G., Arévalo, R., Crespo, C., Okazaki, K., Hidaka, H., Aijón, J., and Alonso, J.R. (1999). Coexpression of neurocalcin with other calcium-binding proteins in the rat main olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 407, 404–414.
- Bronshtein, A.A., and Minor, A. V (1977). [Regeneration of olfactory flagella and restoration of the electroolfactogram following application of triton X-100 to the olfactory mucosa of frogs]. *Tsitologiya* 19, 33–39.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–187.
- Caggiano, M., Kauer, J.S., and Hunter, D.D. (1994). Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13, 339–352.
- Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., and Lledo, P.M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6, 507–518.
- Carter, L.A., MacDonald, J.L., and Roskams, A.J. (2004). Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24, 5670–5683.
- Chanson, M., Derouette, J.-P., Roth, I., Foglia, B., Scerri, I., Dudez, T., and Kwak, B.R. (2005). Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim. Biophys. Acta* 1711, 197–207.
- Chehrehasa, F., Ekberg, J.A., Lineburg, K., Amaya, D., Mackay-Sim, A., and St John, J.A. (2012). Two phases of replacement replenish the olfactory ensheathing cell population after injury in postnatal mice. *Glia* 60, 322–332.
- Cheung, M.C., Jang, W., Schwob, J.E., and Wachowiak, M. (2013). Functional recovery of odor representations in regenerated sensory inputs to the olfactory bulb. *Front. Neural Circuits* 7, 207.
- Chuah, M.I., and Teague, R. (1999). Basic fibroblast growth factor in the primary olfactory pathway: mitogenic effect on ensheathing cells. *Neuroscience* 88, 1043–1050.
- Chuah, M.I., Choi-Lundberg, D., Weston, S., Vincent, A.J., Chung, R.S., Vickers, J.C., and West, A.K. (2004). Olfactory ensheathing cells promote collateral axonal branching in the injured adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 185, 15–25.
- Chuah, M.I., Hale, D.M., and West, A.K. (2011). Interaction of olfactory ensheathing cells with other cell types in vitro and after transplantation: glial scars and inflammation. *Exp. Neurol.* 229, 46–53.

- Chung, R.S., Woodhouse, A., Fung, S., Dickson, T.C., West, A.K., Vickers, J.C., and Chuah, M.I. (2004). Olfactory ensheathing cells promote neurite sprouting of injured axons in vitro by direct cellular contact and secretion of soluble factors. *Cell Mol Life Sci* 61, 1238–1245.
- Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E.A., and Buzsáki, G. (2010). Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 30, 15298–15303.
- Col, J.A., Matsuo, T., Storm, D.R., and Rodriguez, I. (2007). Adenylyl cyclase-dependent axonal targeting in the olfactory system. *Development* 134, 2481–2489.
- Collazos-Castro, J.E., Muñetón-Gómez, V.C., and Nieto-Sampedro, M. (2005). Olfactory glia transplantation into cervical spinal cord contusion injuries. *J. Neurosurg. Spine* 3, 308–317.
- Costanzo, R.M. (1984). Comparison of neurogenesis and cell replacement in the hamster olfactory system with and without a target (olfactory bulb). *Brain Res.* 307, 295–301.
- Costanzo, R.M., and Graziadei, P.P. (1983). A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bulbectomy in hamster. *J. Comp. Neurol.* 215, 370–381.
- Cragolini, A.B., Huang, Y., Gokina, P., and Friedman, W.J. (2009). Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia* 57, 1386–1392.
- Dai, P., Nakagami, T., Tanaka, H., Hitomi, T., and Takamatsu, T. (2007). Cx43 mediates TGF-beta signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol. Biol. Cell* 18, 2264–2273.
- Denizet, M., Cotter, L., Lledo, P.-M., and Lazarini, F. (2016). Sensory deprivation increases phagocytosis of adult-born neurons by activated microglia in the olfactory bulb. *Brain. Behav. Immun.*
- Dickinson, P.J., Griffiths, I.R., Barrie, J.M., Kyriakides, E., Pollock, G.F., and Barnett, S.C. (1997). Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: evidence from developmental studies. *J. Neurocytol.* 26, 181–189.
- Doerflinger, N.H., Macklin, W.B., and Popko, B. (2003). Inducible site-specific recombination in myelinating cells. *Genesis* 35, 63–72.
- Doucette, J.R. (1984). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat. Rec.* 210, 385–391.
- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3, 433–449.
- Doucette, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J Comp Neurol* 312, 451–466.
- Doucette, R. (1996). Immunohistochemical localization of laminin, fibronectin and collagen type IV in the nerve fiber layer of the olfactory bulb. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 945–959.
- Ekberg, J.A.K., and St John, J.A. (2014). Crucial roles for olfactory ensheathing cells and olfactory mucosal cells in the repair of damaged neural tracts. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 297, 121–128.
- Elias, L.A., Wang, D.D., and Kriegstein, A.R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448, 901–907.
- Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J.R., and Smith, D.P. (2003). Targeted mutation of a Drosophila odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J. Neurosci.* 23, 9906–9912.
- Elsaesser, R., and Paysan, J. (2007). The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neurosci* 8, S1.
- Farbman, A.I. (1990). Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci.* 13, 362–

365.

Farbman, A.I., Brunjes, P.C., Rentfro, L., Michas, J., and Ritz, S. (1988). The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 8, 3290–3295.

Feinstein, P., and Mombaerts, P. (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117, 817–831.

Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A., and Mombaerts, P. (2004). Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2 adrenergic receptor. *Cell* 117, 833–846.

Feron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T., and Mackay-Sim, A. (2005). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain* 128, 2951–2960.

Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–218.

Firestein, S., and Werblin, F. (1989). Odor-induced membrane currents in vertebrate-olfactory receptor neurons. *Science* 244, 79–82.

Fraher, J.P. (2000). The transitional zone and CNS regeneration. *J Anat* 196 (Pt 1, 137–158.

Franceschini, I.A., and Barnett, S.C. (1996). Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol* 173, 327–343.

Frings, S., Benz, S., and Lindemann, B. (1991). Current recording from sensory cilia of olfactory receptor cells in situ. II. Role of mucosal Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ ions. *J. Gen. Physiol.* 97, 725–747.

Frisch, C., Theis, M., De Souza Silva, M.A., Dere, E., Söhl, G., Teubner, B., Namestkova, K., Willecke, K., and Huston, J.P. (2003). Mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43 exhibit increased exploratory behaviour, impaired motor capacities, and changes in brain acetylcholine levels. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2313–2318.

Genter, M.B., Deamer, N.J., Blake, B.L., Wesley, D.S., and Levi, P.E. (1995). Olfactory toxicity of methimazole: dose-response and structure-activity studies and characterization of flavin-containing monooxygenase activity in the Long-Evans rat olfactory mucosa. *Toxicol Pathol* 23, 477–486.

Genter, M.B., Owens, D.M., Carlone, H.B., and Crofton, K.M. (1996). Characterization of olfactory deficits in the rat following administration of 2,6-dichlorobenzonitrile (dichlobenil), 3,3'-iminodipropionitrile, or methimazole. *Fundam. Appl. Toxicol.* 29, 71–77.

Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 87–99.

Giaume, C., Orellana, J.A., Abudara, V., and Sáez, J.C. (2012). Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties. *Methods Mol Biol* 814, 283–303.

Goodenough, D.A., Goliger, J.A., and Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 475–502.

Graziadei, G.A., and Graziadei, P.P. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8, 197–213.

Gudiño-Cabrera, G., Pastor, A.M., de la Cruz, R.R., Delgado-García, J.M., and Nieto-Sampedro, M. (2000). Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport* 11, 467–471.

Guthrie, K.M., and Gall, C.M. (1995). Functional mapping of odor-activated neurons in the olfactory bulb.

Chem. Senses 20, 271–282.

Guthrie, K.M., Anderson, A.J., Leon, M., and Gall, C. (1993). Odor-induced increases in c-fos mRNA expression reveal an anatomical “unit” for odor processing in olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3329–3333.

HALLMAN, B.L., and HURST, J.W. (1953). Loss of taste as toxic effect of methimazole (tapazole) therapy; report of three cases. *J. Am. Med. Assoc.* 152, 322.

Harding, J., Graziadei, P.P., Monti Graziadei, G.A., and Margolis, F.L. (1977). Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Res.* 132, 11–28.

Harding, J.W., Getchell, T. V, and Margolis, F.L. (1978). Denervation of the primary olfactory pathway in mice. V. Long-term effect of intranasal ZnSO₄ irrigation on behavior, biochemistry and morphology. *Brain Res.* 140, 271–285.

Haupt, C., Witte, O.W., and Frahm, C. (2007). Up-regulation of Connexin43 in the glial scar following photothrombotic ischemic injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 89–99.

Hayat, S., Wigley, C.B., and Robbins, J. (2003). Intracellular calcium handling in rat olfactory ensheathing cells and its role in axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 22, 259–270.

Hinds, J.W., Hinds, P.L., and McNelly, N. a (1984). An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: evidence for long-lived receptors. *Anat. Rec.* 210, 375–383.

Hinkerohe, D., Smikalla, D., Haghikia, A., Heupel, K., Haase, C.G., Dermietzel, R., and Faustmann, P.M. (2005). Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia* 52, 85–97.

Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., and Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 28, 5207–5217.

Ibáñez, C.F., and Simi, A. (2012). p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci.* 35, 431–440.

Igarashi, K.M., Ieki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tanifuji, M., Sakano, H., Chen, W.R., et al. (2012). Parallel Mitral and Tufted Cell Pathways Route Distinct Odor Information to Different Targets in the Olfactory Cortex. *J. Neurosci.* 32, 7970–7985.

Imai, T., Suzuki, M., and Sakano, H. (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* (80-.). 314, 657–661.

Iwema, C.L., Fang, H., Kurtz, D.B., Youngentob, S.L., and Schwob, J.E. (2004). Odorant Receptor Expression Patterns Are Restored in Lesion-Recovered Rat Olfactory Epithelium. *Neuroscience* 24, 356–369.

Jang, W., Youngentob, S.L., and Schwob, J.E. (2003). Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion. *J. Comp. Neurol.* 460, 123–140.

Jessen, K.R., Morgan, L., Stewart, H.J., and Mirsky, R. (1990). Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109, 91–103.

Jia, C., Doherty, J.P., Crudgington, S., and Hegg, C.C. (2009). Activation of purinergic receptors induces proliferation and neuronal differentiation in Swiss Webster mouse olfactory epithelium. *Neuroscience* 163, 120–128.

- Kafitz, K.W., and Greer, C.A. (1999). Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* 25, 99–110.
- Kang, N., Baum, M.J., and Cherry, J.A. (2009). A direct main olfactory bulb projection to the “vomeronasal” amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur. J. Neurosci.* 29, 624–634.
- Kapur, J.N., Sahoo, P.K., and Wong, A.K.C. (1985). A New Method for Gray-Level Picture Thresholding Using the Entropy of the Histogram. *Comput. Vis. Graph. Image Process.* 29, 273–285.
- Kardami, E., Dang, X., Iacobas, D.A., Nickel, B.E., Jeyaraman, M., Srisakuldee, W., Makazan, J., Tanguy, S., and Spray, D.C. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 245–264.
- Karpuk, N., Burkovetskaya, M., Fritz, T., Angle, A., and Kielian, T. (2011). Neuroinflammation leads to region-dependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity. *J. Neurosci.* 31, 414–425.
- Kawamoto, M., Tamura, M., Ohno, K., Kawasaki, Y., Mori, K., Shikina, T., Noda, K., and Kubo, T. (2003). The alteration of odor-induced c-Fos immunoreactivity in the rat olfactory bulb after olfactory nerve transection. *J Neurol* 250, 51–54.
- Keller, A., and Vosshall, L.B. (2007). Influence of odorant receptor repertoire on odor perception in humans and fruit flies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5614–5619.
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J., and Bakker, J. (2006). Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem. Senses* 31, 315–323.
- Kikuta, S., Sakamoto, T., Nagayama, S., Kanaya, K., Kinoshita, M., Kondo, K., Tsunoda, K., Mori, K., and Yamasoba, T. (2015). Sensory deprivation disrupts homeostatic regeneration of newly generated olfactory sensory neurons after injury in adult mice. *J Neurosci* 35, 2657–2673.
- Kosaka, K., Sawai, K., Tanaka, C., Imafuji, M., Kamei, A., and Kosaka, T. (2009). Distinct domianial and lamellar distribution of clustered lipofuscin granules in microglia in the main olfactory bulb of young mice. *Neurosci. Res.* 65, 286–295.
- Koulakoff, A., Ezan, P., and Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56, 1299–1311.
- Kreher, S.A., Mathew, D., Kim, J., and Carlson, J.R. (2008). Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron* 59, 110–124.
- Lakatos, A., Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (2000). Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* 32, 214–225.
- Lankford, K.L., Sasaki, M., Radtke, C., and Kocsis, J.D. (2008). Olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory, phagocytic, and myelinating properties in the X-irradiated spinal cord not shared by Schwann cells. *Glia* 56, 1664–1678.
- Leung, C.T., Coulombe, P.A., and Reed, R.R. (2007). Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10, 720–726.
- Levai, O., Breer, H., and Strotmann, J. (2003). Subzonal organization of olfactory sensory neurons projecting to distinct glomeruli within the mouse olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 458, 209–220.
- Li, X., Zhao, H., Tan, X., Kostrzewa, R.M., Du, G., Chen, Y., Zhu, J., Miao, Z., Yu, H., Kong, J., et al. (2015). Inhibition of connexin43 improves functional recovery after ischemic brain injury in neonatal rats. *Glia* 63, 1553–1567.

- Li, Y., Field, P.M., and Raisman, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277, 2000–2002.
- Li, Y., Field, P.M., and Raisman, G. (2005). Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia* 52, 245–251.
- Liao, Y., Day, K.H., Damon, D.N., and Duling, B.R. (2001). Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9989–9994.
- Liberia, T., Blasco-Ibáñez, J.M., Nácher, J., Varea, E., Zwafink, V., and Crespo, C. (2012). Characterization of a population of tyrosine hydroxylase-containing interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *Neuroscience* 217, 140–153.
- Liebich, H.G. (1975). [Structure of the upper airways of the white rat (*Mus rattus norvegicus*, var. *albinos*)]. *Anat. Anz.* 138, 170–179.
- Lima, C., Escada, P., Pratas-Vital, J., Branco, C., Arcangeli, C.A., Lazzeri, G., Maia, C.A.S., Capucho, C., Hasse-Ferreira, A., and Peduzzi, J.D. (2010). Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair* 24, 10–22.
- Lledo, P., Alonso, M., and M, G. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179–193.
- Locatelli, F.F., and Relat, L. (2014). Mosaic activity patterns and their relation to perceptual similarity: Open discussions on the molecular basis and circuitry of odor recognition. *J. Neurochem.* 131, 546–553.
- Lohr, C., Thyssen, A., and Hirnet, D. (2011). Extrasynaptic neuron-glia communication: The how and why. *Commun. Integr. Biol.* 4, 109–111.
- Lu, P., Yang, H., Culbertson, M., Graham, L., Roskams, A.J., and Tuszynski, M.H. (2006). Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 26, 11120–11130.
- Luo, A.H., Cannon, E.H., Wekesa, K.S., Lyman, R.F., Vandenberg, J.G., and Anholt, R.R.H. (2002). Impaired olfactory behavior in mice deficient in the ?? subunit of Go. *Brain Res.* 941, 62–71.
- MacFarlane, S.N., and Sontheimer, H. (2000). Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* 30, 39–48.
- Mackay-Sim, A., and St John, J.A. (2011). Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries. *Exp. Neurol.* 229, 174–180.
- Mackay-Sim, A., Féron, F., Cochrane, J., Bassingthwaite, L., Bayliss, C., Davies, W., Fronek, P., Gray, C., Kerr, G., Licina, P., et al. (2008). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain* 131, 2376–2386.
- Macrides, F., and Schneider, S.P. (1982). Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol* 208, 419–430.
- Marshall, D.A., and Maruniak, J.A. (1986). Masera's organ responds to odorants. *Brain Res.* 366, 329–332.
- Matarazzo, V., Cohen, D., Palmer, A.M., Simpson, P.J., Khokhar, B., Pan, S.J., and Ronnett, G. V. (2004). The transcriptional repressor *Mecp2* regulates terminal neuronal differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 44–58.
- Michalski, J.-P., Anderson, C., Beauvais, A., De Repentigny, Y., and Kothary, R. (2011). The proteolipid protein promoter drives expression outside of the oligodendrocyte lineage during embryonic and early postnatal development. *PLoS One* 6, e19772.

- Miller, S.J., Li, H., Rizvi, T.A., Huang, Y., Johansson, G., Bowersock, J., Sidani, A., Vitullo, J., Vogel, K., Parysek, L.M., et al. (2003). Brain lipid binding protein in axon-Schwann cell interactions and peripheral nerve tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2213–2224.
- Ming, G.-L., Guo-li, M., and Hongjun, S. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223–250.
- Miyamichi, K. (2005). Continuous and Overlapping Expression Domains of Odorant Receptor Genes in the Olfactory Epithelium Determine the Dorsal/Ventral Positioning of Glomeruli in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 25, 3586–3592.
- Miyamichi, K., Shlomai-Fuchs, Y., Shu, M., Weissbourd, B.C., Luo, L., and Mizrahi, A. (2013). Dissecting local circuits: Parvalbumin interneurons underlie broad feedback control of olfactory bulb output. *Neuron* 80, 1232–1245.
- Moreno-Flores, M.T., Lim, F., Martín-Bermejo, M.J., Díaz-Nido, J., Avila, J., and Wandosell, F. (2003). High level of amyloid precursor protein expression in neurite-promoting olfactory ensheathing glia (OEG) and OEG-derived cell lines. *J. Neurosci. Res.* 71, 871–881.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., and Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237, 192–197.
- Mori, K., Nagao, H., and Yoshihara, Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286, 711–715.
- Murdoch, B., and Roskams, A.J. (2008). A novel embryonic nestin-expressing radial glia-like progenitor gives rise to zonally restricted olfactory and vomeronasal neurons. *J. Neurosci.* 28, 4271–4282.
- Nagayama, S. (2010). Differential Axonal Projection of Mitral and Tufted Cells in the Mouse Main Olfactory System. *Front. Neural Circuits* 4, 1–8.
- Nagayama, S., Homma, R., and Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits* 8, 98.
- Nagy, J.I., and Rash, J.E. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun. Adhes.* 10, 401–406.
- Nagy, J.I., Ionescu, A.-V., Lynn, B.D., and Rash, J.E. (2003). Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* 44, 205–218.
- Nakamura, T., and Gold, G.H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325, 442–444.
- Nakase, T., Yoshida, Y., and Nagata, K. (2006). Enhanced connexin 43 immunoreactivity in penumbral areas in the human brain following ischemia. *Glia* 54, 369–375.
- O'Dowd, B.F., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1989). Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 67–83.
- Oliet, S.H., Piet, R., and Poulain, D.A. (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292, 923–926.
- Oliveira, V.C., Carrara, R.C. V, Simoes, D.L.C., Saggiaro, F.P., Carlotti, C.G., Covas, D.T., and Neder, L. (2010). Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol. Histopathol.* 25, 1017–1024.
- Orellana, J.A., Sáez, P.J., Shoji, K.F., Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Giaume, C., Bennett,

- M.V.L., and Sáez, J.C. (2009). Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 369–399.
- Pan, Y.W., Kuo, C.T., Storm, D.R., and Xia, Z. (2012). Inducible and Targeted Deletion of the ERK5 MAP Kinase in Adult Neurogenic Regions Impairs Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb and Several Forms of Olfactory Behavior. *PLoS One* 7.
- Pannasch, U., and Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci.* 36, 405–417.
- Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Syková, E., and Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8467–8472.
- Pannasch, U., Freche, D., Dallérac, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., et al. (2014). Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat. Neurosci.* 17, 549–558.
- Pastrana, E., Moreno-Flores, M.T., Gurzov, E.N., Avila, J., Wandosell, F., and Diaz-Nido, J. (2006). Genes associated with adult axon regeneration promoted by olfactory ensheathing cells: a new role for matrix metalloproteinase 2. *J. Neurosci.* 26, 5347–5359.
- Pastrana, E., Moreno-Flores, M.T., Avila, J., Wandosell, F., Minichiello, L., and Diaz-Nido, J. (2007). BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons. *Neurochem. Int.* 50, 491–498.
- Petreanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J. Neurosci.* 22, 6106–6113.
- Pinching, a J., and Powell, T.P. (1971). The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 9, 379–409.
- Piras, E., Franzén, A., Fernández, E.L., Bergström, U., Raffalli-Mathieu, F., Lang, M., and Brittebo, E.B. (2003). Cell-specific expression of CYP2A5 in the mouse respiratory tract: effects of olfactory toxicants. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1545–1555.
- Price, J.L., and Powell, T.P.S. (1970). the Morphology of the Granule Cells of the Olfactory Bulb. *J. Cell Sci* 7, 91–123.
- Puche, A.C., and Shipley, M.T. (1999). Odor-induced, activity-dependent transneuronal gene induction in vitro: mediation by NMDA receptors. *J. Neurosci.* 19, 1359–1370.
- Raisman, G., and Li, Y. (2007). Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells. *Nat Rev Neurosci* 8, 312–319.
- Ramer, L.M., Au, E., Richter, M.W., Liu, J., Tetzlaff, W., and Roskams, A.J. (2004). Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* 473, 1–15.
- Ramón-Cueto, A., and Valverde, F. (1995). Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* 14, 163–173.
- Ramón-Cueto, A., Pérez, J., and Nieto-Sampedro, M. (1993). In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 5, 1172–1180.
- Ramón-Cueto, A., Cordero, M.I., Santos-Benito, F.F., and Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25, 425–435.
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., and Deloulme, J.-C. (2007).

S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55, 165–177.

Rela, L., Bordey, A., and Greer, C.A. (2010). Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* 58, 665–678.

Rela, L., Piantanida, A.P., Bordey, A., and Greer, C.A. (2015). Voltage-dependent K(+) currents contribute to heterogeneity of olfactory ensheathing cells. *Glia*.

Ressler, K.J., Sullivan, S.L., and Buck, L.B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73, 597–609.

Ressler, K.J., Sullivan, S.L., and Buck, L.B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79, 1245–1255.

Rieger, A., Deitmer, J.W., and Lohr, C. (2007). Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* 55, 352–359.

Rodrigues, L.S., Targa, A.D.S., Nosedá, A.C.D., Aurich, M.F., Da Cunha, C., and Lima, M.M.S. (2014). Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 383.

Rodriguez-Gil, D.J., Bartel, D.L., Jaspers, A.W., Mobley, A.S., Imamura, F., and Greer, C. a. (2015). Odorant receptors regulate the final glomerular coalescence of olfactory sensory neuron axons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201417955.

Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* (80-.). 322, 1551–1555.

Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J.D., Bonvento, G., and Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18442–18446.

Roux, L., Madar, A., Lacroix, M.M., Yi, C., Benchenane, K., and Giaume, C. (2015). Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J Neurosci* 35, 15339–15352.

Runyan, S.A., and Phelps, P.E. (2009). Mouse olfactory ensheathing glia enhance axon outgrowth on a myelin substrate in vitro. *Exp Neurol* 216, 95–104.

Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., and Beyer, E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 83, 1359–1400.

Sakamoto, T., Kondo, K., Kashio, A., Suzukawa, K., and Yamasoba, T. (2007). Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs via apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *J. Neurosci. Res.* 85, 548–557.

Sargiannidou, I., Vavlitou, N., Aristodemou, S., Hadjisavvas, A., Kyriacou, K., Scherer, S.S., and Kleopa, K.A. (2009). Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects. *J Neurosci* 29, 4736–4749.

Sawada, M., Kaneko, N., Inada, H., Wake, H., Kato, Y., Yanagawa, Y., Kobayashi, K., Nemoto, T., Nabekura, J., and Sawamoto, K. (2011). Sensory Input Regulates Spatial and Subtype-Specific Patterns of Neuronal Turnover in the Adult Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 31, 11587–11596.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675.

Schnell, S.A., Staines, W.A., and Wessendorf, M.W. (1999). Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue. 47, 719–730.

- Schoppa, N.E., and Urban, N.N. (2003). Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends Neurosci* 26, 501–506.
- Schroder, W., Hager, G., Kouprijanova, E., Weber, M., Schmitt, A.B., Seifert, G., and Steinhuser, C. (1999). Lesion-induced changes of electrophysiological properties in astrocytes of the rat dentate gyrus. *Glia* 28, 166–174.
- Schwarzenbacher, K., Fleischer, J., and Breer, H. (2005). Formation and maturation of olfactory cilia monitored by odorant receptor-specific antibodies. *Histochem. Cell Biol.* 123, 419–428.
- Schwob, J.E., Szumowski, K.E., and Stasky, A.A. (1992). Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival. *J. Neurosci.* 12, 3896–3919.
- Schwob, J.E., Huard, J.M., Luskin, M.B., and Youngentob, S.L. (1994). Retroviral lineage studies of the rat olfactory epithelium. *Chem Senses* 19, 671–682.
- Schwob, J.E., Youngentob, S.L., and Mezza, R.C. (1995). Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol.* 359, 15–37.
- Shepherd, G.M. (1972). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52, 864–917.
- Su, C.Y., Menuz, K., and Carlson, J.R. (2009). Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell* 139, 45–59.
- Su, Z., Chen, J., Qiu, Y., Yuan, Y., Zhu, F., Zhu, Y., Liu, X., Pu, Y., and He, C. (2013). Olfactory ensheathing cells: the primary innate immunocytes in the olfactory pathway to engulf apoptotic olfactory nerve debris. *Glia* 61, 490–503.
- Sullivan, S.L., Bohm, S., Ressler, K.J., Horowitz, L.F., and Buck, L.B. (1995). Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium. *Neuron* 15, 779–789.
- Suzukawa, K., Kondo, K., Kanaya, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Ushio, M., Kaga, K., and Yamasoba, T. (2011). Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage. *J. Comp. Neurol.* 519, 2154–2174.
- Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–823.
- Taniuchi, M., Clark, H.B., Schweitzer, J.B., and Johnson, E.M. (1988). Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J. Neurosci.* 8, 664–681.
- Theis, M., Söhl, G., Eiberger, J., and Willecke, K. (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* 28, 188–195.
- Timsit, S., Martinez, S., Allinquant, B., Peyron, F., Puellas, L., and Zalc, B. (1995). Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J. Neurosci.* 15, 1012–1024.
- Tisay, K.T., and Key, B. (1999). The extracellular matrix modulates olfactory neurite outgrowth on ensheathing cells. *J. Neurosci.* 19, 9890–9899.
- Triolo, D., Dina, G., Lorenzetti, I., Malaguti, M., Morana, P., Del Carro, U., Comi, G., Messing, A., Quattrini, A., and Previtali, S.C. (2006). Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J. Cell Sci.* 119, 3981–3993.
- Valverde, F., and Lopez-Mascaraque, L. (1991). Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol* 307, 658–674.

- Vassar, R., Ngai, J., and Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74, 309–318.
- Vassar, R., Chao, S.K., Sitcheran, R., Nuiiez, M., Vosshall, L.B., and Axel, R. (1994). Topographic Organization of Sensory Projection to the Olfactory Bulb. *Cell* 79, 981–991.
- Wallraff, A., Kohling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., and Steinhauser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 26, 5438–5447.
- Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93, 47–60.
- Wewetzer, K., Kern, N., Ebel, C., Radtke, C., and Brandes, G. (2005). Phagocytosis of O4+ axonal fragments in vitro by p75- neonatal rat olfactory ensheathing cells. *Glia* 49, 577–587.
- Whitman, M.C., and Greer, C.A. (2007). Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Dev Neurobiol* 67, 1079–1093.
- Willhite, D.C., Nguyen, K.T., Masurkar, A. V, Greer, C.A., Shepherd, G.M., and Chen, W.R. (2006). Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12592–12597.
- Williams, S.K., Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (2004). Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins. *J Comp Neurol* 470, 50–62.
- Woodhall, E., West, A.K., and Chuah, M.I. (2001). Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 88, 203–213.
- Wu, C.H., Chien, H.F., Chang, C.Y., and Ling, E.A. (1997). Heterogeneity of antigen expression and lectin labeling on microglial cells in the olfactory bulb of adult rats. *28*, 67–75.
- Xie, F., Zhou, X., Genter, M.B., Behr, M., Gu, J., and Ding, X. (2011). The tissue-specific toxicity of methimazole in the mouse olfactory mucosa is partly mediated through target-tissue metabolic activation by CYP2A5. *Drug Metab. Dispos.* 39, 947–951.
- Xie, F., Fang, C., Schnittke, N., Schwob, J.E., and Ding, X. (2013). Mechanisms of permanent loss of olfactory receptor neurons induced by the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: Effects on stem cells and noninvolvement of acute induction of the inflammatory cytokine IL-6. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 598–607.
- Xiong, W., and Chen, W.R. (2002). Dynamic gating of spike propagation in the mitral cell lateral dendrites. *Neuron* 34, 115–126.
- Xu, W., and Slotnick, B. (1999). Olfaction and peripheral olfactory connections in methimazole-treated rats. *Behav. Brain Res.* 102, 41–50.
- Xu, X.M., Guénard, V., Kleitman, N., Aebischer, P., and Bunge, M.B. (1995). A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp. Neurol.* 134, 261–272.
- Yan, Z., Tan, J., Qin, C., Lu, Y., Ding, C., and Luo, M. (2008). Precise Circuitry Links Bilaterally Symmetric Olfactory Maps. *Neuron* 58, 613–624.
- Yang, H., He, B.-R., and Hao, D.-J. (2015). Biological roles of olfactory ensheathing cells in facilitating neural regeneration: a systematic review. *Mol. Neurobiol.* 51, 168–179.

Zack, G.W., and Rogers, E. (1977). Automatic Measurement of Sister Chromatid Exchange Frequency. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 11–14.

Zhang, J., Zhao, G.-Q., Qu, J., Che, C.-Y., Lin, J., Jiang, N., Zhao, H., and Wang, X.-J. (2016). Expression of S100B during the innate immune of corneal epithelium against fungi invasion. *Int. J. Ophthalmol.* 9, 191–197.

Zhou, J.-J., Cheng, C., Qiu, Z., Zhou, W.-H., and Cheng, G.-Q. (2015). Decreased connexin 43 in astrocytes inhibits the neuroinflammatory reaction in an acute mouse model of neonatal sepsis. *Neurosci. Bull.* 31, 763–768.

Zuo, Y., Lubischer, J.L., Kang, H., Tian, L., Mikesch, M., Marks, A., Scofield, V.L., Maika, S., Newman, C., Krieg, P., et al. (2004). Fluorescent proteins expressed in mouse transgenic lines mark subsets of glia, neurons, macrophages, and dendritic cells for vital examination. *J Neurosci* 24, 10999–11009.

(1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.* 9, 62–66.